

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Analysen des SR-Proteins Npl3 in der Translation und  
Charakterisierung von  
SR-Domänen-vermittelten Protein-Interaktionen  
von Npl3**

**Inaugural-Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Medizin der



Vorgelegt von

**Claudia Baierlein**

aus Dresden

Marburg, 2013

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 19.11.13  
angenommen.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. H. Krebber

Korreferent: Prof. Dr. R. Lill

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	1
Tabellenverzeichnis.....	4
Zusammenfassung .....	5
Summary .....	7
1        Einleitung .....	8
1.1    Molekularer Transport über die Kernmembran .....	8
1.1.1    Reifung und Transport des ribosomalen 60S Partikels.....	10
1.2    Das SR-Protein Npl3 .....	13
1.2.1    mRNA-Transport mithilfe des Exportadapters Npl3.....	15
1.2.2    Prä-60S-Export mithilfe von Npl3 .....	18
1.3    Die Translation .....	18
1.3.1    Die eukaryotische Translationsinitiation .....	19
1.3.2    Regulationsmechanismen in der Translation .....	23
2        Material und Methoden .....	25
2.1    Wichtige Geräte und Programme.....	25
2.2    Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	26
2.3    Stämme .....	28
2.3.1 <i>Escherichia coli</i> Stämme.....	28
2.3.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme .....	29
2.4    Plasmide .....	32
2.5    Kultivierung von Stämmen.....	34
2.5.1    Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	34
2.5.2    Kultivierung von Hefe .....	35
2.6    Molekularbiologische Verfahren .....	37

2.6.1	Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA .....	37
2.6.2	Transformation von Hefe mit DNA .....	37
2.6.3	Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe.....	38
2.6.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefe.....	39
2.6.5	Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) .....	39
2.6.6	Dot-Blot-Analyse zur Detektion von poly(A <sup>+</sup> )-RNA.....	40
2.7	Zellbiologische Methoden mit Hefe.....	41
2.7.1	Fluoreszenz in situ Hybridisierung von poly(A <sup>+</sup> )-RNA.....	41
2.7.2	Immunfluoreszenz-Färbung.....	43
2.7.3	GFP-Mikroskopie.....	44
2.7.4	Radioaktive Markierung von Proteinen zur Bestimmung der Proteinneusynthese in vivo .....	44
2.8	Proteinbiochemische Methoden .....	45
2.8.1	Herstellung von Zelllysaten.....	45
2.8.2	Ko-Immunopräzipitation zur Analyse von Protein-Protein und Protein- RNA Interaktionen .....	46
2.8.3	Affinitätsreinigung heterolog exprimierter Proteine für Interaktionsstudien.....	48
2.8.4	Separierung von Ribosomen mittels Saccharose- Dichtegradientenzentrifugation .....	49
2.8.5	Fällung von Proteinen .....	50
2.8.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	50
2.8.7	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	52
2.8.8	Westernblot .....	53
3	Ergebnisse .....	55
3.1	Die Npl3-Npl3-Interaktionsdomäne ist essentiell für die Überlebensfähigkeit von Zellen .....	55



3.1.1	Die Interaktion zwischen Npl3-Proteinen ist unabhängig von anderen Faktoren .....	55
3.1.2	Die minimale Interaktionsdomäne von Npl3-Molekülen liegt im C-Terminus und ist essentiell .....	56
3.2	Die Interaktionsdomäne für Npl3-Moleküle überlappt mit der Bindedomäne für den Importrezeptor Mtr10 .....	59
3.2.1	Die Relokalisation von <i>npl3Δ100</i> in den Zellkern hat marginale Wachstumsvorteile .....	62
3.2.2	<i>npl3Δ100</i> ist nicht verstärkt mit Polysomen assoziiert .....	63
3.3	Interagierende Npl3-Moleküle lokalisieren im Kern und im Zytoplasma....	64
3.4	Eine gestörte Npl3-Npl3-Interaktion korreliert mit Translations-defekten	65
3.4.1	<i>NPL3</i> -Interaktionsmutanten besitzen einen funktionsfähigen Transport von poly(A) <sup>+</sup> RNA .....	65
3.4.2	<i>NPL3</i> -Interaktionsmutanten verfügen über einen ungestörten Prä-60S-Transport.....	67
3.4.3	<i>NPL3</i> -Interaktionsmutanten sind durch Translationsdefekte gekennzeichnet.....	69
3.5	Ein Defekt in der Npl3-Npl3-Interaktion geht mit einer gestörten Monosomenbildung an mRNA einher .....	74
3.5.1	Das Polysomenprofil von <i>np13Δ100</i> -Zellen ist durch verlangsamte Translationsinitiationsereignisse gekennzeichnet.....	74
3.5.2	In <i>np13Δ100</i> -Zellen sind keine Reifungsdefekte von 60S-Ribosomen erkennbar.....	76
3.6	<i>NPL3</i> kann Störungen in der Monosomenbildung kompensieren .....	79
3.7	Effektive Monosomenbildung wird durch die Verbindung von Npl3 mit dem Rpl10-haltigen 60S-Partikel unterstützt .....	83
3.8	Eine Überexpression der Interaktionsdomäne im Kern stört die Npl3-Npl3-Interaktion und die Monosomenbildung.....	86

4	Diskussion .....	90
4.1	Wildtypisches Npl3 wirkt <i>in vivo</i> nicht translationsinhibierend, sondern unterstützend für die globale Translation .....	92
4.2	In welchem Zusammenhang steht die Npl3-Npl3-Interaktion mit der Funktion in der Translation? .....	94
4.3	Beeinflussen Modifizierungen von Npl3 im C-Terminus die Npl3-Npl3-Interaktion oder die Translation? .....	95
4.4	Welche Funktion hat Npl3 in der Unterstützung der Translation? .....	96
4.4.1	Der Zusammenhang zwischen Npl3 und dem ribosomalen Protein Rpl10 in der Monosomenformation .....	97
4.4.2	Die Monosomenformation für die Translation wird durch Npl3 unterstützt .....	103
	Literaturverzeichnis .....	107
	Abkürzungen .....	117

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zytoplasmatische Reifung der Prä-60S-Untereinheit.....	12
Abbildung 2: Schematische Domänenstruktur von Npl3 mit Modifizierungsstellen im C-Terminus. ....	14
Abbildung 3: Transportzyklus des pendelnden SR-Proteins Npl3 durch den Export von mRNAs.. ....	17
Abbildung 4: Anerkanntes Modell der eukaryotischen kappen-abhängigen Translationsinitiation. ....	21
Abbildung 5: Die physikalische Interaktion von Npl3-Molekülen ist nicht von einzelsträngiger RNA abhängig. ....	55
Abbildung 6: Der C-Terminus von Npl3 vermittelt die Interaktion von Npl3-Molekülen. ....	57
Abbildung 7: Die minimale Interaktionsdomäne von Npl3-Molekülen ist für das Überleben der Zellen essentiell.. ....	58
Abbildung 8: Die Interaktionsdomäne für Npl3-Proteine überlappt stark mit der Bindedomäne für den Importrezeptor Mtr10.. ....	61
Abbildung 9: Der Kernimport von <i>npl3Δ100</i> hat einen mäßigen Einfluss auf die Komplementation von <i>npl3Δ</i> . ....	62
Abbildung 10: Mtr10-interaktionsdefektes <i>npl3Δ100</i> ist nicht verstärkt Polysomen-assoziiert.. ....	63
Abbildung 11: Die Interaktion zwischen Npl3-Molekülen findet im Kern und Zytoplasma statt.....	65
Abbildung 12: Der Transport von poly(A)+RNA in interaktionsdefekten Mutanten von <i>NPL3</i> ist ungestört.. ....	66
Abbildung 13: Npl3 ist ein Prä-60S-Exportrezeptor und kann Transportdefekte in einer Mutante kompensieren.. ....	68
Abbildung 14: Der ribosomale Export ist unbeeinflusst in Mutanten mit gestörter Npl3-Interaktion.....	69

Abbildung 15: Die Sensitivität der Interaktionsmutante <i>np13Δ100</i> auf den Translationsinhibitor Cycloheximid ist vergleichbar mit der Sensitivität von Mutanten der Faktoren der späten Translationsinitiation. ....	70
Abbildung 16: Die Translation in Interaktionsmutanten von <i>NPL3</i> ist stark verringert .....	72
Abbildung 17: Die physikalische Interaktion zwischen eIF4G, einer Untereinheit des mRNA-Kappen-Bindekomplexes, und Npl3 ist indirekt und wird in vivo über RNA vermittelt. ....	73
Abbildung 18: Das Polysomenprofil von <i>np13Δ100</i> -Zellen ist durch einen Schulter-Phänotyp charakterisiert und deutet auf verlangsamte Translationsinitiationsereignisse hin.....	74
Abbildung 19: Die gestörte Monosomenbildung in der Mutante <i>np13Δ100</i> wird durch die verringerte physikalische Interaktion der ribosomalen Untereinheiten verdeutlicht. ....	75
Abbildung 20: Verschiedene Mutanten zeigen einen Schulter-Phänotyp im Polysomenprofil. ....	76
Abbildung 21: Das Verhältnis der ribosomalen Untereinheiten in <i>np13Δ100</i> -Zellen ist wildtypisch .....	77
Abbildung 22: Der Phänotyp von <i>np13Δ100</i> -Zellen ändert sich nicht durch unterstützten 60S-Export .....	78
Abbildung 23: Der Einbau von Rpl10 in zytoplasmatische 60S-Partikel in <i>np13Δ100</i> -Zellen ist ungestört.....	79
Abbildung 24: Die Kombination von Defekten in der Verbindung ribosomaler Untereinheiten mit einer fehlenden Interaktion von Npl3-Molekülen ist tödlich für Zellen .....	80
Abbildung 25: <i>NPL3</i> kompensiert Defekte in der Verbindung von ribosomalen Untereinheiten in der Mutante <i>rpl10(G161D)</i> .....	82
Abbildung 26: Die Expression von <i>FUN12</i> kann den Schulter-Phänotyp im Polysomenprofil von <i>np13Δ100</i> abschwächen .....	83
Abbildung 27: Die Interaktionsmutante <i>np13Δ100</i> besitzt eine starke Störung in der Bindung an Rpl10-haltige 60S-Partikel.....	84

Abbildung 28: Das Mutantenprotein rpl10(G161D) und Npl3 bleiben auch nach der nicht-permissiven Temperatur mit dem 60S-Partikel assoziiert .....	85
Abbildung 29: Der Einbau von Fun12 (eIF5B) in Initiationskomplexe scheint in <i>npl3Δ100</i> -Zellen nicht gestört zu sein.....	86
Abbildung 30: Die Interaktion von Npl3-Molekülen wird durch Überexpression der Npl3-Interaktionsdomäne gemindert .....	87
Abbildung 31: Die Störung der Interaktion zwischen Npl3-Molekülen im Kern führt zur erhöhten Toxizität und zur reduzierten Bildung von Monosomen an mRNA.....	88
Abbildung 32: Modell für die Unterstützung von Npl3 in der Monosomenbildung für die Translationsinitiation.....	105

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	26
Tabelle 2: Antikörper .....	27
Tabelle 3: Kits.....	28
Tabelle 4: Enzymatische Produkte.....	28
Tabelle 5: Hefestämme .....	29
Tabelle 6: Plasmide .....	32
Tabelle 7: Zellkern-rekrutierte, nicht-ribosomale Faktoren der zytoplasmatischen Prä-60S-Untereinheit .....	100
Tabelle 8: Einige, nicht-ribosomale, zytoplasmatische Reifefaktoren des Prä-60S- Partikels.....	101

## Zusammenfassung

Im Gegensatz zu vielzelligen Organismen existieren in *Saccharomyces cerevisiae* nur drei SR-Proteine. Diese fungieren als pendelnde Adapterproteine im nukleozytoplasmatischen Transport von mRNAs. Ein wichtiger Vertreter ist Npl3, welches auch mit aktiv translatierten mRNPs (*messenger ribonucleoproteins*) assoziiert ist. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Npl3 neben der Funktion des mRNA-Exports in das Zytoplasma in weiteren Prozessen eine Bedeutung hat. So konnte dazu beigetragen werden Npl3 als Prä-60S-Exportfaktor zu identifizieren. Außerdem konnte nachgewiesen werden, daß Npl3 über den Export und die zytoplasmatische Reifung hinaus mit dem Rpl10-haltigen 60S-Partikel assoziiert. Somit besitzt Npl3 das Potential über die Bindung an translationskompetente 60S-Untereinheiten die Translation zu beeinflussen. Tatsächlich konnte die vorliegende Studie eine verringerte Translationseffizienz in Hefezellen als Folge einer Verkürzung der SR-Domäne von Npl3 zeigen. Dagegen stellten sich der mRNA- und der Prä-60S-Export aus dem Zellkern sowie die zytoplasmatische Reifung des 60S-Partikels unbeeinträchtigt dar. Zusätzlich wiesen die Ergebnisse darauf hin, daß eine generelle Methylierung bzw. die Phosphorylierungsstelle an Position 411 in der SR-Domäne von Npl3 nicht essentiell für die Translation ist. Vielmehr bedingt die Verkürzung der SR-Domäne eine gestörte Bindung von Npl3 an das translationskompetente 60S-Partikel und daraus folgernd eine Störung der Monosomenformation in der Translationsinitiation. Dieser Defekt in der Monosomenbildung beruht auf einer ineffizienten Bindung von 60S-Partikeln an mRNA-rekrutierte 43S-Initiationskomplexe. Verschiedene Suppressionsexperimente und genetische Analysen in dieser Arbeit legen eine Rolle von Npl3 in Prozessen nahe, die mit den Funktionen von Rpl10 und Fun12 assoziiert sind.

Des weiteren konnte eine Homomer-Bildung von Npl3-Molekülen nachgewiesen werden, welche vom N-terminalen Bereich der SR-Domäne abhängig ist. Zusätzlich demonstrierten Ko-Immunopräzipitations- und Immunfluoreszenz-Experimente, daß dieser Domänenbereich von Npl3 im Wesentlichen auch für die Bindung des Zellkernimportrezeptors Mtr10 entscheidend ist. Weitere Ergebnisse deuteten darauf hin, daß sich die Homomer-Bildung von Npl3 positiv auf die Translationsinitiation auswirkt.

Demnach kann vorliegende Arbeit Npl3, und insbesondere seiner SR-Domäne, eine essentielle Aufgabe für die Translation zuweisen und lässt dabei auf eine Funktion von Npl3 im Prozess der Monosomenbildung während der Translationinitiation, wie auch im letzten zytoplasmatischen Reifeschritt des Prä-60S-Partikels schließen.



## Summary

*Saccharomyces cerevisiae* possesses only three SR-proteins in contrast to multi-cellular organisms. They are functioning as shuttling adaptor proteins in the nucleo-cytoplasmic transport of mRNAs. One important representative is Npl3 which is associated with actively translated mRNPs (*messenger ribonucleoproteins*). This study focused on a potential additional role of Npl3 besides its function in exporting mRNAs to the cytoplasm. The work contributed to the identification of Npl3 as a pre60S-export factor. Moreover, it was shown that Npl3 stays bound to the Rpl10-containing 60S-particle beyond the export and cytoplasmic maturation of pre60S-subunits. As a consequence, Npl3 has the capability to assist in translation by its association with translation competent 60S-particles. More specifically, truncating the SR-domain of Npl3 led to a reduced translation efficiency of yeast cells. In contrast, nuclear mRNA- and pre60S-export as well as the cytoplasmic maturation of 60S-particles were not substantially affected. Additionally, the results indicated that methylation in general or the phosphorylation site on position S411 in the SR-domain of Npl3 is not essential for translation. Rather, the truncation of the SR-domain resulted in a decreased binding of Npl3 to translation competent 60S-particles and a perturbation of monosome formation during translation initiation. This monosome formation defect is a result of inefficient binding of 60S-particles to mRNA-recruited 43S-initiation complexes. Different suppression experiments and genetic analyses in this work suggested a role of Npl3 in processes that are associated with the functions of Rpl10 and Fun12.

Furthermore, an Npl3 homomer formation, dependent on the N-terminal region of the SR-domain, was demonstrated. Additionally, this specific part of the SR-domain of Npl3 was crucial for the binding of the nuclear import receptor Mtr10 supported by co-immunoprecipitation and immunofluorescence experiments. Moreover, the results indicate that the formation of Npl3-homomers might influence translation initiation positively. In summary, this work was able to assign Npl3 with its SR-domain an essential role for translation and suggested a function of Npl3 in the process of monosome formation during translation initiation as well as in the last cytoplasmic maturation step of pre60S-particles.

# 1 Einleitung

## 1.1 Molekularer Transport über die Kernmembran

Durch die räumliche Trennung der DNA vom Zytoplasma in der eukaryotischen Zelle muss ein molekularer Austausch zwischen den Kompartimenten über die Zellkernmembran erfolgen. Die Kernhülle besitzt dafür supramolekulare Protein-Kanäle, die sogenannten Kernporenkomplexe (NPC= *nuclear pore complex*). Moleküle mit einer geringeren Größe als 40 kDa können passiv durch die Kanäle diffundieren (Kiseleva et al., 1998). Jedoch wurde auch ein Größenausschluss für Moleküle von 60 kDa beschrieben (Görllich and Kutay, 1999). Trotz der Diffusionsmöglichkeit unterliegt der Transport kleinerer Moleküle vorwiegend dem Signal-vermittelten, regulierten Transportweg über den NPC (Breeuwer and Goldfarb, 1990). Der Zellkerntransport von makromolekularen Strukturen scheint aber generell über den Rezeptor-NPC-Signalweg Bedingung zu sein. Die Mehrheit der makromolekularen Transporte bewerkstelligen Rezeptorproteine namens Karyopherine, speziell der Karyopherin- $\beta$ -Familie, welche schon früh-evolutionär Funktionen im Zellkerntransport übernahmen und daher stark konserviert sind (O'Reilly et al., 2011). Sie sind vorwiegend für den Transport von Proteinen und nicht-kodierender RNAs verantwortlich. In *S. cerevisiae* sind bislang 14 und in humanen Zellen 19 solcher  $\beta$ -Karyopherine bekannt und untersucht (Chook and Süel, 2011). Je nach Transportrichtung werden sie in Importine oder Exportine eingeteilt und können daher Transportsignale für den Kernimport (NLS, *nuclear localization signal*) oder Kernexport (NES, *nuclear export signal*) erkennen und binden. Wobei die Bindung der Importine an NLS-haltige Proteine im Zytoplasma der Zeit-limitierende Schritt des Transports *in vivo* zu sein scheint (Dange et al., 2008). Zellkerntransportsignale können ganz unterschiedlich gestaltet sein und unterliegen keiner speziellen Konsensussequenz. Auch die Erkennung dieser durch die Karyopherine ist nicht exklusiv, sondern stellen sich in einigen Fällen redundant dar (Fried and Kutay, 2003). Zusätzlich sind Karyopherine durch eine hohe Affinität zu Phenylalanin-Glycin-reichen (FG-) Sequenzen der Nukleoporene, Komponenten des NPCs, und zu der GTPase Ran gekennzeichnet (Wente and Rout, 2010). Interessanterweise ist nicht die Translokation der Substrate über die Pore selbst energiekonsumierend, sondern die

Aufrechterhaltung des Ran-GTP-Gradienten. Dieser treibt den gerichteten Transport zwischen Kern und Zytoplasma an. Durch die hohe Konzentration von Ran-GTP im Zellkern und dessen Assoziation an den Exportrezeptor selbst, wird die Substratbindung gefördert. Nach dem Transport ins Zytoplasma stimuliert RanGAP (*Ran-specific GTPase activating protein*) mit den Proteinen RanBP1 und RanBP2 (*Ran binding proteins*) die GTPase-Aktivität von Ran und GTP wird hydrolysiert. Dabei entsteht eine niedrige Konzentration an Ran-GTP im Zytoplasma, was wiederum die Interaktion von Substrat mit Importrezeptoren verstärkt. Ran-GDP wird über den Faktor NTF2 (*nuclear transport factor*) in den Zellkern transportiert, wo für die Bildung von Ran-GTP der nukleäre Faktor RanGEF (*Ran-specific guanine nucleotide exchange factor*) für den GDP-Austausch zuständig ist (Güttler and Görlich, 2011; Wentz and Rout, 2010).

Beispiele für ein importierendes Karyopherin ist Mtr10 (Transportin-SR in höheren Eukaryoten), welches SR-Proteine bindet, u. a. Npl3, und in den Kern transportiert (Senger et al., 1998). Des Weiteren ist der hochkonservierte Faktor Xpo1 (CRM1 in höheren Eukaryoten) zu erwähnen. Xpo1 besitzt ein breites Substratspektrum und ist der Hauptspieler im Proteinexport. Mithilfe des Adapterproteins Nmd3 ist es unter anderem in den nukleo-zytoplasmatischen Transport ribosomaler 60S-Partikel involviert (Gadal et al., 2001).

Obwohl vor kurzem CRM1-abhängige Transportwege einiger mRNA-Spezies in höheren Eukaryoten beschrieben wurden, wird die Mehrheit der mRNAs, anders als beim Transport von Proteinen bzw. nicht-kodierender RNAs, nicht über Karyopherine und unabhängig vom Ran-Gradienten exportiert (Natalizio and Wentz, 2013). Vielmehr spielt daher die Verknüpfung von Transkription und Prozessierung mit dem nukleo-zytoplasmatischen Transport von mRNA eine große Rolle. Dabei werden kotranskriptionell zuerst über die C-terminale Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II einzelne Faktoren und später durch ein Folge von Assoziationen ganze Proteinkomplexe auf das Transkript geladen, die gleichzeitig Einfluss auf die Transkriptionseffizienz sowie auf nachfolgende Prozesse (wie Spleißing oder Polyadenylierung) bis hin zum Transport der mRNA durch den NPC ins Zytoplasma haben können. Je nach Bedingungen entstehen dabei RNA-Protein-Partikel, die aus einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine bestehen können, sogenannte mRNPs (*messenger ribonucleoproteins*) (Natalizio and Wentz, 2013). Letztendlich scheint jedoch das entscheidende Signal für die überwiegende Zahl der

exportkompetenten mRNAs die Rekrutierung von Mex67 (TAP oder NXF1 in höheren Eukaryoten) zu sein (Natalizio and Wente, 2013; Segref et al., 1997). Über die Bildung eines Heterodimers mit Mtr2 (p15 oder NXT1 in höheren Eukaryoten) kann der Kontakt zum NPC hergestellt werden. Die treibende Kraft für den gerichteten Transport nach dem bislang bestehenden Modell ist die DEAD-Box-RNA-Helikase Dbp5 (DDX19 in humanen Zellen) und agiert dabei auf der zytoplasmatischen Seite des NPCs in unmittelbarem Kontakt zum Nukleoporin Nup159/Rat7 (Nup124 in humanen Zellen) und seinem Kofaktor Gle1 (Hodge et al., 1999; Schmitt et al., 1999). Dbp5 bindet ATP-abhängig mRNA und ist dadurch über eine mechanische Aktivität befähigt eine Umgestaltung der RNA-bindenden Proteine des mRNPs zu bewerkstelligen. Die Dissoziation von Transportfaktoren, die den Kontakt mit der Kernpore herstellen, scheint eine Zielrichtung des Transportsubstrats herzustellen (Tieg and Krebber, 2012).

### **1.1.1 Reifung und Transport des ribosomalen 60S Partikels**

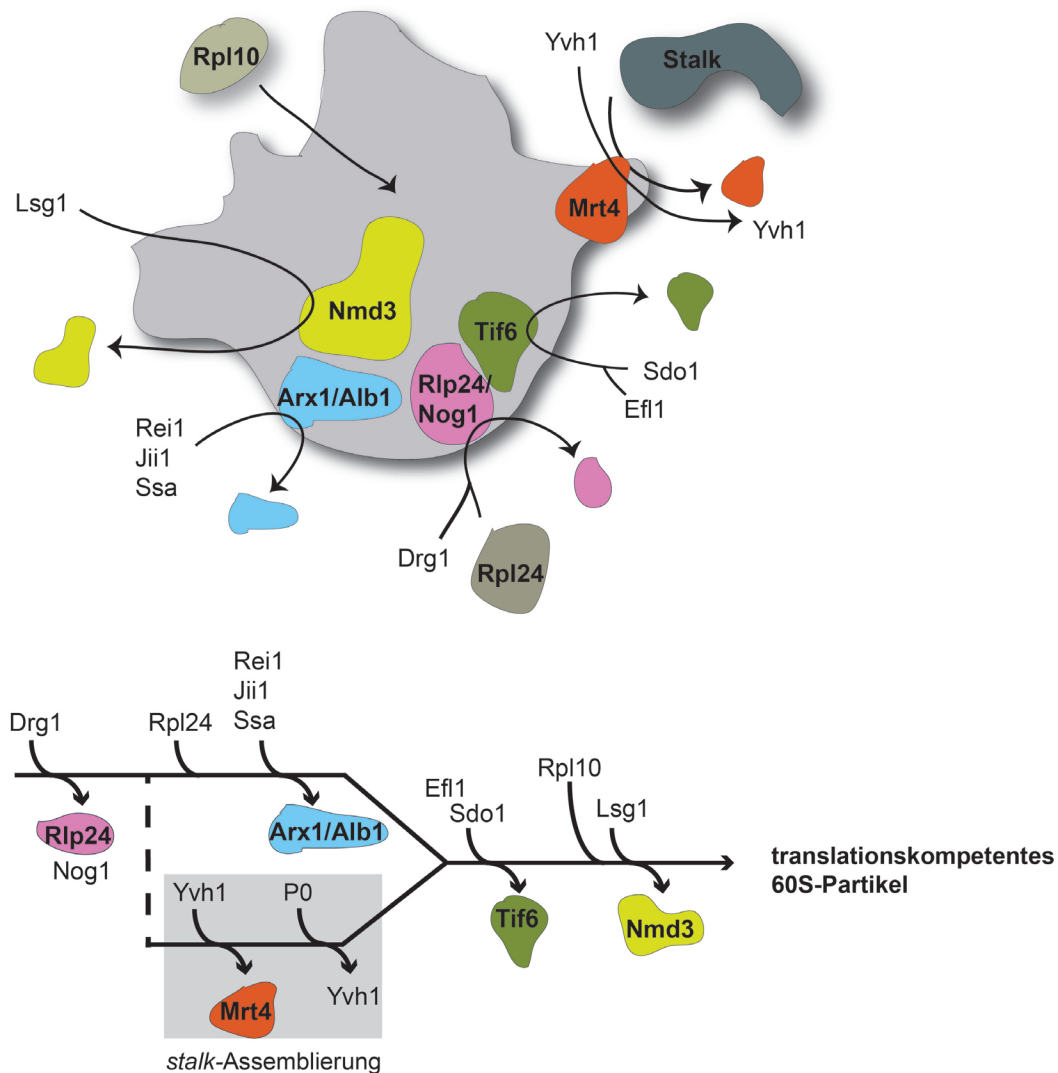
In *S. cerevisiae* besteht die ausgereifte 60S ribosomale Untereinheit aus drei ribosomalen RNAs (5S, 5,8S und 25S rRNA) und 46 ribosomalen Proteinen, währenddessen die 40S-Untereinheit aus der 18S rRNA und 33 Proteinen zusammengesetzt ist (Jenner et al., 2012). Die Transkription der rDNA findet im Nukleolus statt, wobei die Prä-5S rRNA über die RNA-Polymerase III und die 35S rRNA, das Vorläufertranskript beider rRNAs der ribosomalen Untereinheiten, über die RNA-Polymerase I synthetisiert wird. Ribosomale Proteine und Faktoren der Prozessierungsmaschinerie, wie snoRNAs und nicht-ribosomale Proteine (*trans-acting factors*) können schon kotranskriptionell binden und die Reifung der Untereinheiten einleiten. Der erste so gebildete Ribosomenkomplex wird das Prä-90S-Ribosom genannt, der sich interessanterweise durch eine große Menge 40S-assoziiierter Proteine und durch nur sehr wenig 60S-assoziierte Faktoren auszeichnet. Durch die Spaltung der 35S rRNA entsteht das Prä-40S- und das Prä-60S- Partikel, die in das Kernplasma entlassen werden. Die Mehrheit der Prä-60S-Faktoren kann daraufhin an das Partikel binden.

Der 27S rRNA-Vorläufer der 60S-Untereinheit wird erst in 25S und 7S rRNA prozessiert, später entsteht aus der 7S rRNA die 5,8S rRNA. Währenddessen werden vor allem die Prä-60S Partikel unter großem Energie-Aufwand mithilfe von GTPasen und ATPasen umgestaltet (Kressler et al., 2010; Strunk and Karbstein, 2009). Im Gegensatz zu den

relativ wenigen Reifungsschritten des 40S-Partikels sind rund 100 Prozessierungsfaktoren an der Biogenese der großen ribosomalen Untereinheit beteiligt (Kressler et al., 2010; Panse and Johnson, 2010).

Der nukleo-zytoplasmatische Transport prä-ribosomaler Untereinheiten ist Ran- und NPC-abhängig. Interessanterweise werden beide Untereinheiten von dem Exportrezeptor Xpo1 gebunden, wobei das 60S-Partikel zusätzlich über den Adapter Nmd3 kontaktiert wird (Gadal et al., 2001; West et al., 2007). Aber auch in den mRNA-Export involvierte Proteine wie Mex67-Mtr2 und Npl3, der pendelnde 60S-Reifefaktor Arx1, sowie Ecm1 wurden als 60S-Export-Faktoren, die einen direkten Kontakt mit der Kernpore herstellen können, identifiziert (Bradatsch et al., 2007; Hackmann et al., 2011; Hung et al., 2008; Yao et al., 2007, 2008, 2010). Einige Prozessierungsfaktoren bleiben während des Transports ins Zytoplasma noch am Partikel assoziiert. Dort finden dann späte Biogeneseschritte der Prä-60S-Untereinheit statt, die eine geordnete Abfolge bedingen (Abbildung 1). So wird zuerst die Bindestelle für die ribosomale Komponente Rpl24 über die Entlassung von Rlp24 und Nog1 durch die Aktivität der ATPase Drg1 befreit. Nach dem Einbau von Rpl24 wird der Transportfaktor Arx1 mit Alb1 über die ATPasen Ssa1/Ssa2 mit Unterstützung des Zink-Finger-Proteins Rei1 und Jjj1 vom Partikel entfernt (Lo et al., 2010; Meyer et al., 2010).

Nach der Dissoziation von Rlp24 wird, gleichzeitig zu den oben genannten Umgestaltungsprozessen, die stiel-ähnliche Basis des Ribosoms (*stalk base*) über die Dissoziation von Mrt4 durch Yvh1 und den darauffolgenden Einbau der Strukturkomponente P0 assembliert (Kemmler et al., 2009; Lo et al., 2009, 2010). Das Protein P0 bildet dabei die Binde-Plattform für weitere Komponenten, P1 und P2. Die Formation der stiel-ähnlichen Ribosomenstruktur (*stalk*) ist besonders für die spätere Bindung von Elongationsfaktoren in der Translation bedeutend (Panse and Johnson, 2010).



**Abbildung 1: Zytoplasmatische Reifung der Prä-60S-Untereinheit.** Die oben dargestellte Zeichnung fasst die zytoplasmatischen Reifeschritte am Prä-60S-Partikel zusammen. Darunter ist die Abfolge der einzelnen Reifeschritte in einem Pfeilschema dargestellt.: Die Aktivität der ATPase Drg1 löst die Inkorporation von Rpl24 durch die Dissoziation von Nog1 und Rlp24 aus. Dies führt wiederum zur Rekrutierung des Zink-Finger-Proteins Rei1, welches mithilfe von Jii1 und der ATPase Ssa (Hsp70) die Ablösung von Arx1 und Alb1 verursacht und somit den Ausgang im 60S-Partikel für die Polypeptidkette während der Translation freigibt. Währenddessen scheint gleichzeitig Yvh1 den Austausch von Mrt4 gegen P0 für die Ausbildung der stiel-ähnlichen Ribosomenstruktur (*stalk*) zu unterstützen. Über den *stalk* assoziiert die GTPase Efl1 und katalysiert die Entlassung von Tif6 von der für das 40S-Partikel vorgesehenen Bindestelle. Die Dissoziation von Tif6 aktiviert die GTPase Lsg1, welches in Rpl10-Abhängigkeit den Exportadapter Nmd3 entlässt, was für die stabile Integration von Rpl10 in das 60S-Partikel sorgt. (Modifiziert nach Lo et al., 2010; Oeffinger, 2010; Panse, 2011)

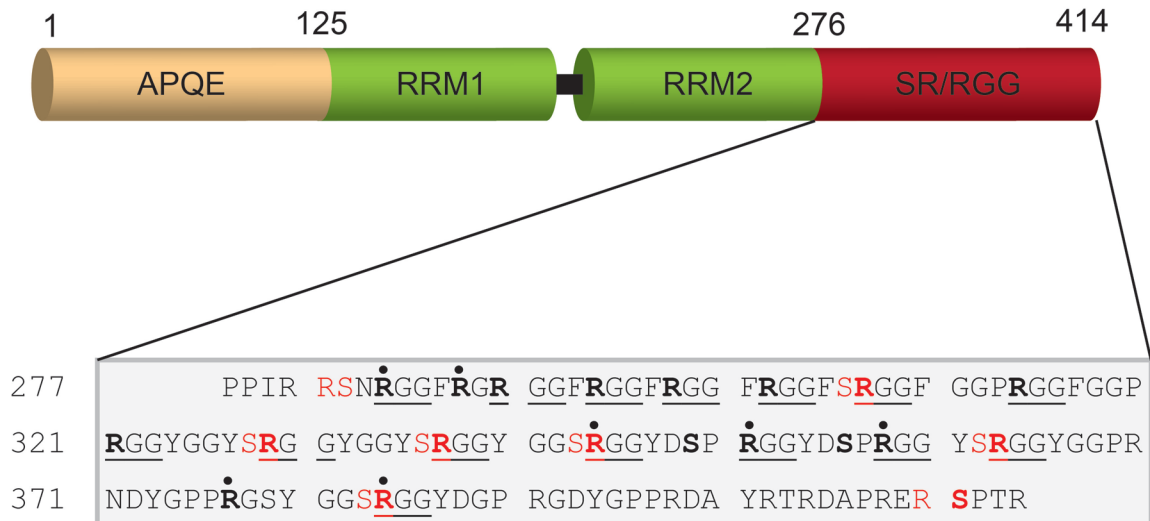
Weiterhin wird über die *stalk*-Struktur sehr wahrscheinlich die Rekrutierung der GTPase Efl1 gefördert, welche zusammen mit Sdo1 die Ablösung von Tif6 vom Partikel katalysiert und die Schnittstelle für die 40S-Verbindung freigibt (Lo et al., 2010; Menne et al., 2007; Senger et al., 2001).

Am Ende dieser Reaktionsreihe in der zytoplasmatischen Biogenese des 60S-Ribosoms steht die stabile Inkorporation von Rpl10, über die Entlassung von Nmd3 durch Lsg1 (Hedges et al., 2005; Lo et al., 2010; West and Hedges, 2005). Die finale zytoplasmatische Reifung ist nicht nur für die Herstellung translationskompetenter ribosomaler Untereinheiten, sondern auch für die Entlassung und das Recycling der Reifefaktoren notwendig. Eine Störung des Recyclings kann zu einer nukleären Depletion der Faktoren und damit indirekt zu einer negativen Beeinflussung der Prozessierung oder des ribosomalen Exports führen (Panse and Johnson, 2010).

## 1.2 Das SR-Protein Npl3

Die funktionelle Klasse der SR-Proteine ist zuerst in höheren Eukaryoten beschrieben worden. Einige der nukleär lokalisierten SR-Proteine dienen dem Spleißen von Intronhaltigen Transkripten und stellen eine gut charakterisierte und essentielle Gruppe dar (Busch and Hertel, 2012). Neben vielfältigen nukleären Funktionen der SR-Proteine sind bislang drei pendelnde Vertreter in Zusammenhang mit mRNA-Export beschrieben worden, SRp20, 9G8 und ASF/SF2 (Caceres et al., 1998; Huang et al., 2003; Risso et al., 2012).

In der Bäckerhefe sind interessanterweise ebenso drei SR-ähnliche pendelnde Proteine gefunden worden (Birney et al., 1993; Häcker and Krebber, 2004; Windgassen and Krebber, 2003). Eines dieser SR-Proteine ist Npl3. Neben der Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zu den pendelnden, humanen SR-Proteinen (Birney et al., 1993) besitzt Npl3 ein sehr ähnliches Transportverhalten und wird durch humane Homologe in der Hefe transportiert und modifiziert (Huang and Steitz, 2005; und 2.1.1). Das Protein Npl3 ist durch vier Domänen charakterisiert: eine N-terminale Domäne mit APQE-Motiv-Wiederholungen unbekannter Funktion, zwei folgenden RNA-Erkennungsdomänen (RRM, RNA recognition motif) und der C-terminalen Domäne, die durch die Überlappung von SR/RS- und RGG-Wiederholungen gekennzeichnet ist und das NLS für den Kernimport enthält. Die SR-reiche C-Domäne von Npl3 ist auch der Proteinbereich, der überwiegend modifiziert wird (Abbildung 2). Die Serinreste der SR/RS-Sequenzen stellen dabei potentielle Phosphorylierungsstellen und die RGG-Peptide potentielle Methylierungsstellen dar (Fu, 1995; McBride et al., 2005).



**Abbildung 2: Schematische Domänenstruktur von Npl3 mit Modifizierungsstellen in der SR/RGG-Domäne.** Die N-terminale Domäne zeichnet sich durch APQE-Wiederholungen aus, gefolgt von 2 RNA-Erkennungsmotiven RRM1 und RRM2 und der C-terminalen SR/RGG-Domäne. In der Aminosäuresequenz der C-Domäne sind SR/RS-Wiederholungen (rot) und RGG-Wiederholungen (unterstrichen) gekennzeichnet. Methylierte Argininreste (R) bzw. phosphorylierte Serinreste (S) sind fett dargestellt, wobei entweder S349 oder S356 phosphoryliert ist. Kreise markieren Argininreste, die variabel dimethyliert, monomethyliert oder unmethyliert *in vivo* vorliegen können. Fett-unterlegte Argininreste ohne Kreis liegen dimethyliert vor. RRM=RNA recognition motif. (modifiziert nach: Häcker and Krebber, 2004; McBride et al., 2005; Siebel and Guthrie, 1996)

In Hefe wurde Hmt1 (hnRNP Arg N-Methyltransferase 1) als hauptsächliche Typ I Arginin-Methyltransferase identifiziert und gilt als Funktionsäquivalent zu PRMT1 in Mammalia (Gary et al., 1996). Für die Methylierung von Npl3 an 17 Arginin-Resten im C-Terminus ist ausschließlich Hmt1 verantwortlich. So sind nach der Deletion von *HMT1* keine Methylierungen an Npl3 mehr detektierbar (McBride et al., 2005).

Der Serinrest an Position 411 wird durch die Kinasen Sky oder Ck2 phosphoryliert und wurde mit einer Funktion im mRNA-Export bisher gut charakterisiert (Dermody et al., 2008; Gilbert et al., 2001). Des weiteren wurde mindestens eine weitere Phosphorylierung an Position S349 oder S356 mit bisher unbekannter Funktion nachgewiesen (Bodenmiller et al., 2010; Ficarro et al., 2002). Anzumerken ist, daß sich die Methylierung im C-Terminus negativ auf die Phosphorylierung der Stelle S411 durch Sky1 auswirken kann (Lukasiewicz et al., 2007).



### 1.2.1 mRNA-Transport mithilfe des Exportadapters Npl3

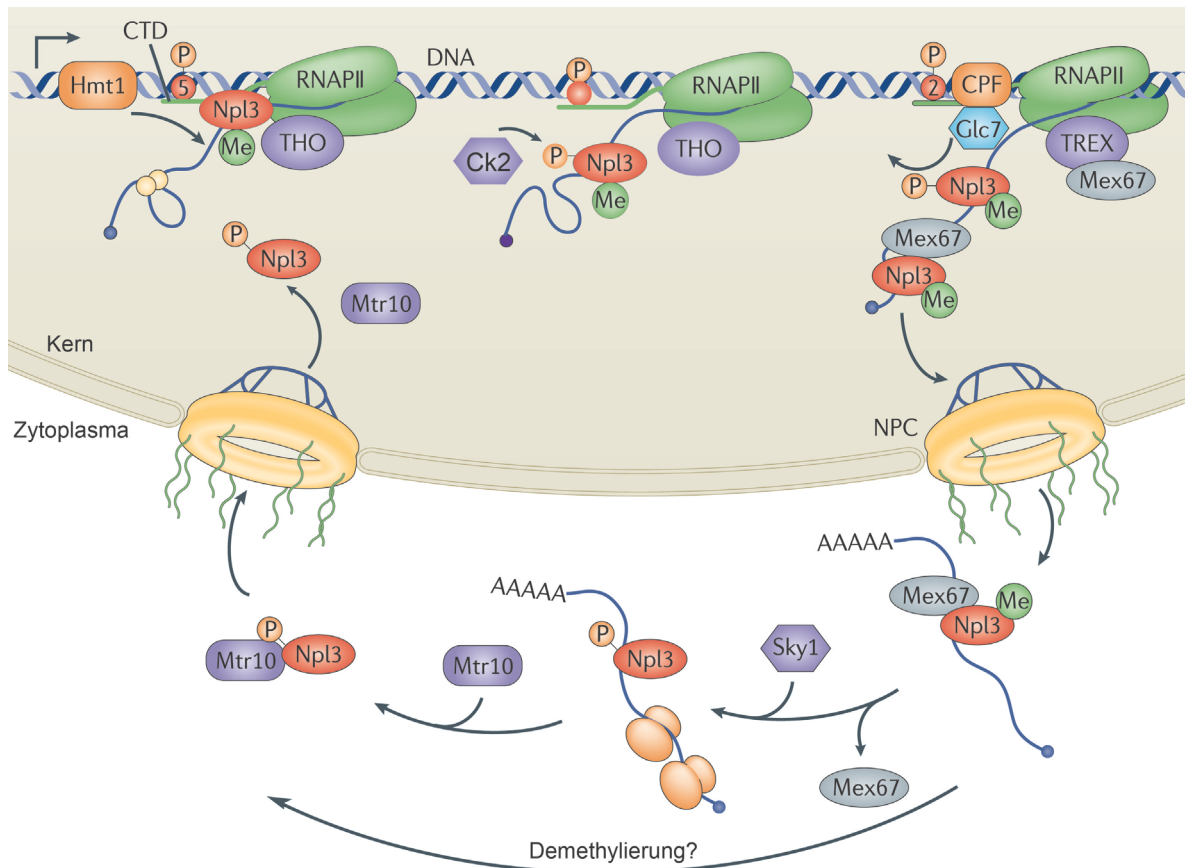
Für einen Großteil der Exportereignisse über die Kernporen, binden Exportrezeptoren ihr Substrat nicht selbst sondern mithilfe von Adapter-Molekülen. In Hefe ist eines davon der sehr gut beleuchtete Exportadapter Npl3, welches sehr wahrscheinlich über eine direkte Interaktion mit der RNA-Polymerase II auf mRNA-Moleküle geladen wird (Dermody et al., 2008; Lei et al., 2001) und dabei positiv auf die Transkription und die Rekrutierung von Spleiß-Faktoren wirkt (Bucheli and Buratowski, 2005; Kress et al., 2008). Npl3 gehört zur Familie der Serin-Arginin(SR)-reichen-Proteine, pendelt zwischen Kern und Zytoplasma und wurde zunächst als essentieller Faktor und Hauptadapter für den mRNA-Export identifiziert (Lee et al., 1996). In Abbildung 3 ist eine Übersicht des Transportzyklus von Npl3 mit mRNA in einigen wichtigen Teilschritten dargestellt.

Bisher konnte keine spezifische mRNA-Erkennungssequenz für Npl3 bestimmt werden. Neben der Bindung einer größeren Anzahl von Transkripten ribosomaler Gene scheint es aber keine Präferenz gegenüber mRNA-Klassen zu besitzen (Kim Guisbert et al., 2005). Eine Rekrutierung von Npl3 verhilft dem mRNA-Molekül zu einer verstärkten Exportkompetenz, da Npl3 vom Exportrezeptor Mex67 gebunden werden kann (Gilbert and Guthrie, 2004). Dieser Exportprozess ist evolutionär konserviert, so binden die in höheren Eukaryoten vorkommenden, pendelnden SR-Proteine mit gleichem Transportverhalten den orthologen heterodimeren Rezeptor TAP-p15 (Mex67-Mtr2 in Hefe) (Huang and Steitz, 2005; Lai and Tarn, 2004). Die Bindeaktivität von Npl3 an Strukturen und sein Exportverhalten kann über post-translationelle Modifikationen von Npl3 beeinflusst werden. So besitzt es nach der kotranskriptionellen Rekrutierung an die RNA über die Interaktion mit der CTD der RNA-Polymerase eine Anti-Terminierungsaktivität und unterstützt so die Elongation des Transkripts (Bucheli and Buratowski, 2005; Dermody et al., 2008). Über die Phosphorylierung durch Ck2 (Casein Kinase 2) höchstwahrscheinlich an Position 411 in der SR-Domäne wird diese Aktivität verringert, dadurch die Assoziation des Schneide- und Polyadenylierungsfaktors CPF (*cleavage and polyadenylation factor*) und gleichsam die Termination der Transkription gefördert (Dermody et al., 2008). Während der 3'-Endformierung des Transkripts wird Npl3 über die Phosphatase-Aktivität der CPF-Komponente Glc7 dephosphoryliert und kann so besser vom Exportrezeptor Mex67 gebunden werden (Gilbert and Guthrie, 2004),

welcher wiederum den Export des mRNPs über den NPC mit der Bindung an Mtr2 vermittelt.

Im Zytoplasma kann die Kinase Sky1 über Phosphorylierung des Serinrests an Position 411 in Npl3 die Bindung des Importrezeptors Mtr10 erhöhen und somit die Dissoziation von Npl3 vom Transkript auslösen (Gilbert et al., 2001). Anzumerken ist, daß die Interaktion zwischen Mtr10 und Npl3 aber nur teilweise von der Phosphorylierung abhängig ist (Gilbert et al., 2001) und die endgültige Ablösung eher die Bindung von Mtr10 bedingt (Windgassen et al., 2004). Auch liegt Npl3 länger mit dem Transportsubstrat gebunden vor, da es mit Polysomen kopräzipitiert (Windgassen et al., 2004). Nach dem Import von Npl3 über das Karyopherin Mtr10 in den Zellkern, steht es dort wieder nukleären Prozessen zur Verfügung.

Unter einigen anderen Proteinen ist auch Npl3 ein Substrat der Methyltransferase Hmt1, welche an transkribierten Genen assoziiert ist (Henry and Silver, 1996; Siebel and Guthrie, 1996; Yu et al., 2004). Neben der Phosphorylierung wird diskutiert, dass auch Methylierung von Npl3 den Export von mRNA beeinflussen kann. Dabei wurde eine Unterstützende Funktion von methyliertem Npl3 in der Regulation der Transkriptionselongation und -termination vorgeschlagen (Chen et al., 2010; Wong et al., 2010). Definitiv ist aber der Transport von Npl3 durch fehlende Methylierung beeinträchtigt. So wird durch die Deletion von *HMT1* die Kernexportrate von Npl3 gemindert (Shen et al., 1998) und die Npl3-Interaktion mit Proteinen verändert (McBride et al., 2005; Yu et al., 2004). Grundsätzlich scheint die Methylierung von Npl3, oder generell mRNA-bindender Proteine, Protein-Protein-Interaktionen zu reduzieren und darüber nachfolgende Schritte wie Exportprozesse zu regulieren bzw. dynamischer zu gestalten (Tutucci and Stutz, 2011).



**Abbildung 3: Transportzyklus des pendelnden SR-Proteins Npl3 durch den Export von mRNAs.** Wahrscheinlich unphosphoryliertes Npl3 wird von der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II (RNAPII) während der frühen Transkription auf die mRNA rekrutiert, wo es Transkriptionselongation und Assoziation von Spleiß-Faktoren unterstützt. Die Transkriptions-assoziierte Methyltransferase Hmt1 methyliert Npl3 besonders im C-Terminus (Me), was den Export von Npl3 begünstigt. Über die Casein Kinase (Ck2)-vermittelte Phosphorylierung am Serinrest 411 wird die Transkriptionsterminierungsaktivität von Npl3 gestärkt, welche die Rekrutierung des *cleavage and polyadenylation factors* (CPF) an die RNAPII fördert. Die CPF-Komponente und Phosphatase Glc7 dephosphoryliert Npl3 und erhöht dadurch für die Bindungsaffinität für Mex67. Über das Exportsignal Mex67 kann das mRNP über den *nuclear pore complex* (NPC) exportiert werden. Im Zytoplasma dissoziiert Mex67 von der mRNA wohingegen Npl3 auf translatierten Transkripten gebunden bleibt. Über die Kinase Sky1 wird Npl3 erneut am Serinrest 411 phosphoryliert und womöglich unterstützt dies die Bindung des Importrezeptors Mtr10. Die Bindung von Mtr10 löst Npl3 vom Transkript und wird in den Zellkern importiert. Nach der RNA-abhängigen Dissoziation von Mtr10, steht Npl3 wiederum recycelt für die erneute Bindung mit mRNA zur Verfügung. Ob eine Demethylierung im Zytoplasma von Npl3 erfolgt oder eine Dephosphorylierung vor der Rekrutierung an mRNA bleibt offen. (modifiziert nach Tutucci and Stutz, 2011).

### 1.2.2 Prä-60S-Export mithilfe von Npl3

Ein weiteres Exportsubstrat für Npl3 neben der mRNA wurde vor kurzem beschrieben. So bindet und transportiert Npl3 Prä-60S-Partikel aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Npl3 scheint schon früh während der 60S-Reifung mit dem 90S-Partikel, speziell der 35S rRNA, zu assoziieren. Nach der nukleären Reifung kann das Prä-60S-Partikel auch Mex67-unabhängig von Npl3 über den NPC transportiert werden. Die Autoren schlagen ein Modell vor, in dem Npl3 über die direkte Bindung an die 25S rRNA den Kontakt mit dem NPC über die Komponente Nup60 herstellt, da die Interaktion zwischen Npl3 mit Nup60 *in vivo* und eine direkte Interaktion von Npl3 mit FG-Motiven und mit 25S rRNA nachgewiesen werden konnte (Hackmann et al., 2011). Ob Npl3 mit dem Prä-60S-Partikel nach dem Export noch länger assoziiert bleibt und die Ablösung ähnlich wie beim mRNA-Transport durch Mtr10 und Npl3-Modifikationen reguliert wird, bleibt zu untersuchen.

## 1.3 Die Translation

Die Biosynthese von Proteinen (Translation) bedingt die Verfügbarkeit aller benötigten Strukturen im Zytoplasma. Deswegen ist in Eukaryoten unter anderem die Funktionalität des Kernexports von RNAs und Ribosomen essentiell. Interessanterweise sind bisher einige Faktoren, bekannt für Kernexportfunktionen auch für Funktionen in der Translation beschrieben worden.

Die Translation lässt sich in drei bis vier Teilschritte untergliedern, die jeweils von einem speziellen Set an Faktoren gesteuert wird: Initiation, Elongation, Termination und Ribosomen-Recycling. Wobei die Prozesse Termination und Ribosomen-Recycling wahrscheinlich nicht getrennt betrachtet werden können, da sie nahtlos in einander übergehen sowie gleiche Faktoren involviert sind.

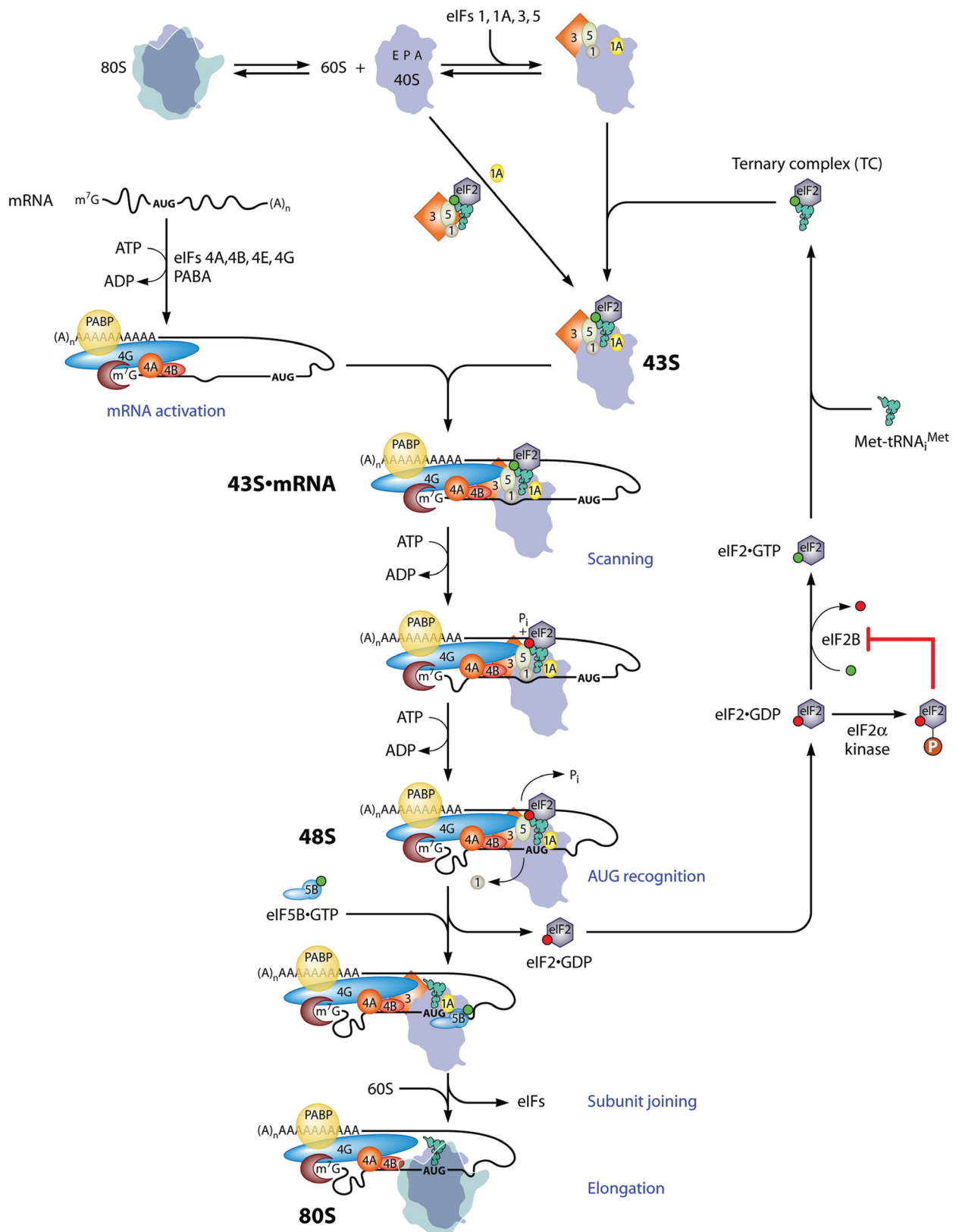
In der Regulation der Genexpression galt lange Zeit die Synthese von RNA, also die Transkription als Kontrollangelpunkt. Doch durch die intensivere Untersuchung der Translation wurden darin mehr und mehr posttranskriptionelle Kontrollmechanismen aufgedeckt (Leppek et al., 2011; Sonenberg and Hinnebusch, 2007). Im Prozess der Translation scheint bisher die Initiation der größte Angriffspunkt für die Steuerung der Proteinbiosynthese zu sein (Sonenberg and Hinnebusch, 2009).

### 1.3.1 Die eukaryotische Translationsinitiation

Die Initiation der Translation in Eukaryoten kann in verschiedene Reaktionen unterteilt werden: mRNA-Aktivierung, Scannen, AUG-Erkennung und die Verbindung der ribosomalen Untereinheiten zum Monosom (Abbildung 4).

Um mRNAs zu decodieren müssen Ribosomen auf das Transkript geladen werden. Dies passiert für den Hauptteil aller mRNAs in Abhängigkeit von der Kappenstruktur. Dafür muss die mRNA in einem translationskompetenten Zustand vorliegen, d. h. die korrekte Beladung mit dem Poly(A)-bindenden Protein PABP, dem Kappenbindekomplex eIF4F (bestehend aus eIF4A, eIF4G und dem Kappen-bindenden eIF4E) und dem Faktor eIF4B. Eine Zirkularisierung translatierter mRNAs über die Verbindung von PABP mit eIF4G wird angenommen und in einem *closed-loop* Modell diskutiert (Topisirovic et al., 2011).

Ein weiterer Schritt ist die Bildung des 43S-Partikels, auch 43S-PIC (*preinitiation complex*) genannt. Dabei wird der ternäre Komplex (TC= *ternary complex*) aus der Initiator-Met-t-RNA und dem GTP-tragenden eIF2 gebildet, bevor dieser mit den Initiationsfaktoren eIF3, eIF5, eIF1 und eIF1A an das 40S-Ribosom binden kann und das 43S-Partikel entsteht. Bei diesem Schritt scheint sich Hefe von anderen Eukaryoten unterscheiden. Demnach kann der TC zusammen mit den Initiationsfaktoren eIF3, eIF5 und eIF1 auch 40S-unabhängig in einem Multifaktorkomplex (MFC) vorliegen. In höheren Eukaryoten wurde dieser Komplex jedoch bisher nicht beschrieben. Die Anlagerung der eIFs an die 60S-Verbindungsstelle der 40S-Untereinheit blockieren dabei die Formation von mRNA-freien Monosomen durch Eigenassoziation von 40S und 60S (Aitken and Lorsch, 2012; Hinnebusch, 2011).



**Abbildung 4: Anerkanntes Modell der eukaryotischen kappen-abhängigen Translationsinitiation.** Beginnend mit der Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten, kann sich ein 43S-Präinitiationskomplex (43S-PIC) aus 40S, eIF1, 1A, 3, 5 und TC (*ternary complex*, eIF2-GTP-Initiator-t-RNA) bilden. Die mRNA wird über die Bindung des eIF4F-Komplexes (eIF4A, E, G) und eIF4B an die Kappe (m<sup>7</sup>G) und Assoziation von PABP an den poly(A)-Schwanz aktiviert. Nach der Rekrutierung des 43-PIC an die mRNA entsteht der Komplex 43S·mRNA, stabilisiert durch eine vernetzte Interaktion zwischen eIF4G, eIF3, eIF5, eIF4B. Das 43S-PIC scannt den 5'UTR mithilfe der Helikase-Aktivität von eIF4A, und einer stabilisierenden Wirkung der mRNA-Struktur über Ded1 und Dhx29. Nach der GTP-Hydrolyse von eIF2 während des Scannvorgangs kann die Startkodon-Erkennung durch Basenpaarung zwischen der Met-tRNA<sup>Met</sup> und dem AUG-Triplett stattfinden. Gleichzeitig dissoziiert eIF1 und P<sub>i</sub>. Es entsteht der 48S-Komplex. Mit der Dissoziation von eIF2-GDP und dem Eintritt von eIF5B-GTP wird das 60S-Partikel an das 40S-Partikel rekrutiert. Durch die GTP-Hydrolyse von eIF5B dissoziieren eIF1A und eIF5B vom Partikel und machen das 80S-Monosom elongationsbereit. eIF2-GDP wird über eIF2B, einen *GTP-exchange factor* (GEF), für eine erneute Assemblierung in TCs zu eIF2-GTP recycelt. Die potentielle Phosphorylierung von eIF2 stellt eine Regulationsmöglichkeit in der Ausbildung von TCs dar. (nach Hinnebusch, 2011)

Für die Rekrutierung des 43S-PICs an die mRNA ist der gesamte Kappenkomplex sowie eIF3 essentiell und wissenschaftliche Befunde stützen, daß insbesondere der Kontakt von eIF4G mit eIF3 notwendig ist. In Mammalia konnte eine Bindedomäne in eIF4G für eIF3 identifiziert werden, während in Hefe diese Bindedomäne fehlt und eher intaktes eIF3 die Ribosomenassoziation an mRNA stimuliert (LeFebvre et al., 2006; Phan et al., 2001). In der jüngeren Literatur wird jedoch die Hauptaufgabe von eIF4G in der PIC-Rekrutierung eingeschränkt. Womöglich ist eIF4G für die PIC-Beladung einer Untergruppe von mRNAs unterstützend, was auf eine unterschiedliche mechanistische Regulation, eventuell über die Heterogenität kappen-assoziiierter Komponenten, hinweist (Hinnebusch and Lorsch, 2012).

Anzumerken ist auch die unterschiedliche Komposition des eIF3-Komplexes in Mammalia und Hefe, dementsprechend besitzt eIF3 aus Mammalia 13 Untereinheiten (eIF3a-m) während Hefe-eIF3 aus nur 5 Hauptuntereinheiten namens eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g und eIF3i (Hefe-Nomenklatur: Tif32, Prt1, Nip1, Tif35, Tif34) und einer assoziierten Untereinheit eIF3j (Hcr1) zusammengesetzt ist (Hinnebusch, 2006).

Des weiteren ist die Helikase eIF4A zu nennen, die die mRNA als Einzelstrang-Matrize nahe der Kappe für die Assoziation des 43S-PIC vorbereitet. Neuere Befunde legen die Involvierung weiterer DEAD-Box-Helikasen nahe. So soll die starke Helikasenaktivität von Ded1 (Hefeortholog des humanen DDX3) sowie das humane DHX29 besonders bei mRNAs mit hochstrukturierten 5'UTRs den Scan-Vorgang unterstützen (Hinnebusch, 2011; Jackson et al., 2010). Das einmal angelagerte 43S-PIC scannt die 5'-UTR über die

Komplementarität des Codons der Initiator-t-RNA. Dabei stellt man sich das 40S-Partikel in einer sogenannten „offenen“ Konformation vor, in der die mRNA leicht durch den mRNA-Bindetunnel gleiten kann. Diese Konformation soll besonders durch eIF1 und eIF1A gefördert werden. Folgend kommt es zur Erkennung des Startcodons (AUG), was dem Eintritt der Met-t-RNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> in die Peptidyl-t-RNA-Stelle (P-site) entspricht. Die AUG-Erkennung induziert die GTP-Hydrolyse von eIF2-GTP durch das GTPase-aktivierende Protein eIF5 und die Bildung eines stabilen 48S-PICs durch Basenpaarung der Initiator-t-RNA mit dem AUG und die Entlassung von eIF1 und des aus der Hydrolyse entstandenen P<sub>i</sub> (*inorganic phosphate*) (Hinnebusch, 2011). Die Konformation des PIC wechselt nun in den geschlossenen Status und der Komplex arretiert. Infolgedessen dissoziiert eIF2-GDP, wahrscheinlich mit eIF5, vom Komplex und geben den C-Terminus von eIF1A für die Bindung mit eIF5B-GTP frei, welches wiederum die Verbindung des PIC mit der 60S-Untereinheit zum elongationskompetenten 80S-Partikel katalysiert. Durch die GTP-Hydrolyse von eIF5B dissoziieren eIF5B-GDP und eIF1A vom Komplex (Fringer et al., 2007). Durch die Ablösung von eIF1A wird die A-Stelle des Ribosoms befreit, folglich kann der Elongationsfaktor eEF1A binden und die Elongation einleiten (Acker et al., 2009). Möglicherweise bleibt der Faktor eIF3 weiterhin gebunden um an nachgeordneten Schritten, wie an dem Recycling oder an den Reinitiiereignissen, teilzunehmen.

Bemerkenswerterweise ist die GTP-Hydrolyse durch eIF5B nicht für die Verbindung der Untereinheiten, sondern für die Entlassung von eIF5B und eIF1A essentiell. So können Monosomen trotz blockierter GTPase-Aktivität von eIF5B formiert werden, aber keine Proteindissoziation auszulösen, was zu einer inhibierten Elongation durch festgesetzte 80S-Partikel am AUG führt (Pestova et al., 2000; Shin et al., 2002). Interessanterweise sind eIF5B (eukaryotisches Ortholog von IF2) und eIF1A (eukaryotisches Ortholog von IF1) die beiden Komponenten, die in allen drei Domänen des Lebens (Archaea, Bacteria, Eukaryota) konserviert sind und einige gleiche Funktionen im Initiationsprozess übernehmen. Es gibt Evidenzen, daß speziell in Eukaryoten eIF5B und eIF1A über ihre beiden C-Domänen miteinander interagieren und dadurch eIF1A die Positionierung von eIF5B unterstützt und folglich die Ribosomen-abhängige GTPase-Aktivität fördern kann (Acker and Lorsch, 2008). Auch zeigten kinetische Analysen, daß eIF5B die Geschwindigkeit der Verbindung der ribosomalen Untereinheiten und die Dissoziation von eIF1A in Abhängigkeit von seiner Konformation stark erhöht (Acker et al., 2009).



Generell sind demnach Translationskomplexe auch ohne eIF5B zur Monosomenformation befähigt, doch die Katalyse durch eIF5B beschleunigt diesen Vorgang in großem Maße.

### 1.3.2 Regulationsmechanismen in der Translation

Die Stärke der Proteinsynthese kann posttranskriptionell im Allgemeinen entweder über die Halbwertszeit der mRNA oder über den Translationsprozess selbst gesteuert werden. Dabei ist die Beladung der mRNA mit Ribosomen der kritischste Faktor, weshalb die meisten der translationellen Regulationen in der Initiation zu finden sind. Prinzipiell nutzt die Zelle verschiedenartige Angriffspunkte, was zu einer globalen Kontrolle der Proteinsynthese über den Hauptteil der mRNAs oder zu einer spezifischen Kontrolle von mRNA-Gruppen führen kann. Oft finden globale Regulationen aufgrund von extrazellulären Stimuli, dem Energie-Status oder der Aminosäure-Verfügbarkeit in der Zelle statt. Das geschieht weitestgehend über Modifizierungen bzw. Phosphorylierung der Haupt-Initiationsfaktoren oder ihrer Bindepartner. Beispiele dafür sind die Phosphorylierung von eIF2, was die Ausbildung von ternären Komplexen (TC) reduziert, und die 4E-Bindeproteine (4E-BP), die im hypophosphorylierten Zustand eine hohe Affinität zu eIF4E besitzen und dadurch eine kompetitive Wirkung auf die eIF4E-eIF4G-Interaktion ausüben (Gebauer and Hentze, 2004; Sonenberg and Hinnebusch, 2009). Doch nicht nur Initiationsfaktoren, die die Rekrutierung von 40S-Partikeln unterstützen, sondern auch ribosomale Untereinheiten können Ansatzstellen für eine translationelle Kontrolle sein. So wurde ein Mechanismus zumindest in Mammalia über die Steuerung der 60S-Verfügbarkeit beschrieben (Gandin et al., 2008). Der Faktor eIF6 (Tif6 in Hefe) spielt eine wesentliche Rolle in der Biogenese von 60S-Partikeln, wobei die Assoziation von eIF6 mit dem 60S-Partikel die 80S-Formierung verhindert. So steuert eIF6 nicht nur die Reifung, sondern im Wesentlichen die Menge an 60S-Untereinheiten, die translationskompetent für die 40S-mRNA-Bindung zur Verfügung steht. Über externe Stimuli kann die Bindung von eIF6 reguliert werden (Brina et al., 2011).

Neben der globalen Regulation wird die Translation spezifischer mRNA-Gruppen meist über spezielle Elemente im 5'UTR oder 3'UTR reguliert. Eine Strategie ist die Sequenz-spezifische Assoziation von RNA-bindenden Proteinen, wobei bisher selten Protein-RNA-Interaktionen im 5'UTR, der Hauptteil jedoch im 3'UTR gefunden wurde. Die Repression über den 5'UTR erfolgt anscheinend über die Blockierung der 43S-Rekrutierung und nicht

über die Anlagerung von eIF4F. Proteine, die im 3'UTR binden, regulieren oft die Länge des poly(A)-Schwanzes, aber es sind auch einige Fälle bekannt in denen der poly(A)-Schwanz unverändert bleibt und eher ein direkter Eingriff des Proteins in die Initiation, insbesondere die Rekrutierung von eIF4F, vermutet wird. So beschreibt das allgemeine Modell der Repression über den 3'UTR eine inhibitorische Ringbildung der mRNA über ein mRNA-bindendes Protein, einem daran bindenden Adapterprotein und der letztendlichen Schließung des Rings über ein Kappen-bindendes Protein (Jackson et al., 2010).

Auch die Zeitspanne für die Bildung von Initiationskomplexen wird zur Kontrolle von der Zelle genutzt. Beispielsweise enthalten 45-50% der Gene in Mammalia und 13% in Hefe *upstream open reading frames* (uORFs). Der Mechanismus kann zusammengefasst als Antenne für die Verfügbarkeit von Initiationskomponenten, speziell TCs, beschrieben werden. Nach der Termination am uORF, wird das 60S-Ribosom und eIF2, sowie die t-RNA entlassen. Dennoch kann ein Teil der so entstandenen 40S-PICs weiterhin den 5'UTR scannen, bleibt aber ohne den Einbau von eIF2-Met-t-RNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> inkompetent ein neues AUG zu erkennen. Die Verfügbarkeit von TCs bestimmt also wie weit der PIC migrieren kann. In diesem Prozess ist die Länge sowie die Sekundärstruktur und somit auch die benötigte Zeit für die Translation des uORFs für eine Reinitiierung des eigentlichen ORFs entscheidend (Hinnebusch, 2011; Jackson et al., 2010).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Wichtige Geräte und Programme

**ÄKTA™purifier 10** mit Fraktionierer (GE Healthcare, Uppsala/Schweden)

**Bio-1D** Quantifizierungsprogramm für Chemilumineszenzsignale (Peqlab, Erlangen/Deutschland)

**Phosphorimager FLA-3000** (FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf/Deutschland) mit Software AIDA Image Analyzer v.4.22

**Chemilumineszenzgerät Fusion SL** (Peqlab, Erlangen/Deutschland)

**Dichtegradientenfractionierungssystem:** Fraktionierer Model Foxy Jr; Optical Unit Type 11; Absorptionsmonitor Model UA-6; Gradient Former Model 160 (Teledyne Isco, Lincoln, Nebraska/USA)

**FastPrep®-24** (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich)

**Fluoreszenzmikroskop Leica DMI6000B** (Leica, Wetzlar/Deutschland) mit der Kamera LEICA DFC360FX

**Geltrocknungsanlage** Model 583 (BioRad Laboratories, Hercules/USA)

**Gradient Master 108** (BioComp Instruments, Fredericton/Kanada)

**Image J** Bildquantifizierung, Peakflächenmessung (Freeware von Wayne Rasband)

**Image Gauge 3.01** Quantifizierung der der Firma Fujifilm, Tokyo/Japan

**Lichtmikroskop Leitz Biomed Typ 020-507-010** (Leica, Wetzlar/Deutschland)

**Q-RT-PCR Gerät Rotor Gene Q** (Qiagen, Hilden/Deutschland)

**Szintillationszähler LS1701** (Beckman Coulter, Krefeld/Deutschland)

**Sonifier W-250 D** (G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland)

**Tetradenmikroskop Nikon Eclipse E400** (Nikon, Düsseldorf/Deutschland)

**Ultrazentrifuge WX Ultra 80** (Thermo Fisher Scientific, Schwerte/Deutschland)

## 2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Soweit es nicht besonders vermerkt ist, wurden alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von den Firmen Acros (Geel, Belgien), GE Healthcare (Freiburg, Deutschland), Apollo Scientific Limited (Derbyshire, England), BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Difco (Detroit, USA), Fisher Scientific (Nidderau, Deutschland), Invitrogen (Frankfurt am Main, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland), Promega (Mannheim, Deutschland), Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland), Serva Feinbiochemika (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Th.Geyer (Renningen, Deutschland) sowie VWR International (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

**Tabelle 1: Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe/Deutschland
Amersham Hybond™-N+ Membran	GE Healthcare, Freiburg/Deutschland
Bacto Yeast nitrogen base w/o amino acids	Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA
Coomassie brilliant blue R-250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/Deutschland
Complete EDTA-free/Protease Inhibitor cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim/Deutschland
Cy3-Oligo-dT <sub>50</sub>	Biospring, Frankfurt/Deutschland
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/Deutschland
DAPI	Merck, Darmstadt/Deutschland
5-Fluoroorotic Acid (5-FOA)	ApolloScientific, Stockport/UK
Formaldehyd Lösung (ACS reagent)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/Deutschland
Galaktose (D (+))	Acros Organics, Geel/Belgien
GFP-Trap_A	ChromoTek, Planegg-Martinsried/Deutschland
Glasperlen 0,2-0,5 mm	Carl Roth, Karlsruhe/Deutschland
Glutathione Sepharose 4B	GE Healthcare, Freiburg/Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe/Deutschland
Hybond N <sup>+</sup> Nylon Membran	GE Healthcare, Freiburg/Deutschland
IgG-Sepharose™ beads	GE Healthcare, Freiburg/Deutschland
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden/Deutschland

Chemikalie	Bezugsquelle
Nitrocellulose Membran (Protran®)	PerkinElmer, Waltham/USA
Objektträger 12 well	Thermo Fisher Scientific, Schwerte/Deutschland
$\gamma$ -[P <sup>32</sup> ]-ATP (SRP-301)	Hartmann Analytik, Braunschweig/Deutschland
Polyallomer Röhrchen für die Ultrazentrifugation	Beckman Coulter, Krefeld/Deutschland
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/Deutschland
Protease inhibitor cocktail for yeast	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/Deutschland
Protein G Sepharose	Applied Biosystems, Foster City/USA
Raffinose	Serva, Heidelberg/Deutschland
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe/Deutschland
[ <sup>35</sup> S]-Methionin (SCIS-103)	Hartmann Analytik, Braunschweig/Deutschland
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe/Deutschland
Salmon sperm DNA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen/Deutschland

**Tabelle 2: Antikörper**

Antikörper	Verdünnung in WB	Bezugsquelle
HRP-Anti-Maus (Ziege)	1:15000	Dianova, Hamburg/Deutschland
HRP-Anti-Kaninchen (Ziege)	1:20000	Dianova, Hamburg/Deutschland
Anti-eIF3a (Kaninchen)	1:1000	Schenkung von L. Valasek, Prag
Anti-eIF3g (Kaninchen)	1:2000	Schenkung von L. Valasek, Prag
Anti-eIF4E (Kaninchen)	1:5000	Schenkung von M. Ashe, Manchester
Anti-Hem15 (Kaninchen)	1:10000	Schenkung von R. Lill, Marburg
Anti-His (Kaninchen)	1:200	Santa Cruz, Heidelberg/Deutschland
Anti-GFP (Kaninchen)	1:2000	Santa Cruz, Heidelberg/Deutschland
Anti-GFP (Maus)	1:2000	Santa Cruz, Heidelberg/Deutschland
Anti-GST (Kaninchen)	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg/Deutschland
Anti-Kaninchen-IgG AlexaFluor®488 (Ziege)		Invitrogen, Frankfurt/Deutschland
Anti-myc (Kaninchen)	1:2000	Santa Cruz, Heidelberg/Deutschland
Anti-Npl3 (Kaninchen)	1:5000	H. Krebber
Anti-Por (Kaninchen)	1:5000	Schenkung von R. Lill, Marburg
Anti-Rpl35 (Kaninchen)	1:5000	Schenkung von M. Seedorf, Heidelberg
Anti-Rps3 (Kaninchen)	1:5000	Schenkung von M. Seedorf, Heidelberg

WB, Western-Blot-Analysen

**Tabelle 3: Kits**

<b>Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Amersham ECL Prime Western	GE Healthcare, Freiburg/Deutschland
Experion™ RNA StdSens Analysis Kit	BioRad Laboratories, Herkules/USA
GoTaq(R) qPCR Master Mix	Promega, Madison, WI/USA
NukleoSpin extract II	Macherey-Nagel, Düren/Deutschland
NucleoSpin RNAII	Macherey-Nagel, Düren/Deutschland
RC DC Protein Assay (containing solution A, B and S)	BioRad Laboratories, Herkules/USA
RNase free DNase I	Qiagen, Hilden/Deutschland
pGEM®-T Vektor System	Promega Corporation, Madison/USA

**Tabelle 4: Enzymatische Produkte**

<b>Produkt</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Maxima Reverse Transcriptase, Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte/Deutschland
Dream Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Schwerte/Deutschland
Phusion® High-Fidelity DNA Polym.	New England Biolabs, Beverly/USA
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Schwerte/Deutschland
T4-Polynukleotidkinase	Thermo Fisher Scientific, Schwerte/Deutschland
Zymolase 20T	Seikagaku corporation, Tokyo/Japan

## 2.3 Stämme

### 2.3.1 *Escherichia coli* Stämme

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der Bakterienstamm *DH5α* mit dem Genotyp (*supE44 lacZU169(80lacM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA69 thi-1 relA149*) verwendet, welcher sich von dem *E. coli*-Stamm *DH1* ableitet. Für die Herstellung von rekombinanten Proteinen wurde der *E. coli*-Stamm *BL21 (DE3)* mit dem Genotyp (*F-*, *dcm*, *ompT*, *hsdS(rB- mB-)*, *galλ (DE3)*) verwendet.

### 2.3.2 *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

**Tabelle 5: Hefestämme**

Stamm-nummer	Genotyp	Quelle
HKY36	<i>MATα ura3-52 leu2Δ1 his3-200</i>	Fred Winston, Boston
HKY45	<i>MATα ura leu ade2 xpo1::LEU2 + p CEN HIS3 xpo1-1</i>	Heike Krebber
HKY124	<i>MATα ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 rat7-1</i>	(Gorsch et al., 1995)
HKY157	<i>MATα ura3 leu2 his3 ade npl3::HIS3 + p CEN URA3 NPL3-myc</i>	(Shen et al., 1998)
HKY160	<i>MATα ura3-1 leu2 his3 lys2 ade2 ade3 npl3::HIS3 + p CEN LEU2 npl3-17</i>	(Lee et al., 1996)
HKY265	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 trp1-901 his3Δ200 gal4Δ gal80Δ</i>	Clontech
HKY270	<i>MATα ura leu ade trp1 mtr10::HIS3 +p CEN TRP1 mtr10-7</i>	(Senger et al., 1998)
HKY380	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 npl3::kanMX4</i>	Euroscarf
HKY381	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0</i>	Euroscarf
HKY408	<i>MATα ura3 leu2 trp1 his3 prt1-1</i>	Mark Ashe, Manchester
HKY578	<i>MATα ura3 leu2 trp1 his3 ade TIF4631-3xmyc</i>	Heike Krebber
HKY611	<i>MATα ura3 leu2 his3 npl3::kanMX4 rat7-1</i>	Heike Krebber
HKY644	<i>MATα ura3 leu2 trp1 his3 ade2 mex67::HIS3 + p CEN LEU2 mex67-5</i>	(Segref et al., 1997)
HKY705	<i>MATα ura3 leu2 trp1 his3 rix1-1</i>	(Bassler et al., 2001)
HKY749	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 npl3::kanMX4 fun12::kanMX4 + p CEN URA3 NPL3</i>	Heike Krebber

**Tabelle 5: Hefestämme (Fortsetzung)**

HKY767	<i>hmt1::kanMX4 rpl10::kanMX4 + p CEN URA3 rpl10(G161D)-GFP</i>	diese Arbeit
HKY802	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 RPL25-3xmyc:HIS3MX6</i>	(Hackmann et al., 2011)
HKY805	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 npl3::kanMX4 RPL25-3xmyc:HIS3MX6</i>	(Hackmann et al., 2011)
HKY812	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 lsg1::kanMX4 + p CEN LEU2 lsg1-2</i>	Heike Krebber
HKY816	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 lsg1::kanMX4 + p CEN LEU2 lsg1-3</i>	Heike Krebber
HKY858	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 rpl10::kanMX4 + p CEN URA3 RPL10-GFP</i>	Heike Krebber
HKY863	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 rpl10::kanMX4 + p CEN URA3 rpl10(G161D)-GFP</i>	Heike Krebber
HKY890	<i>MATα ura3 leu2 his3 lys2 mtr2::kanMX4 + p CEN TRP1 mtr2-21 + p CEN URA3 MTR2</i>	(Bassler et al., 2001)
HKY892	<i>MATα ura3 leu2 his3 lys2 mtr2::kanMX4 + p CEN TRP1 mtr2-33 + p CEN URA3 MTR2</i>	(Bassler et al., 2001)
HKY894	<i>MATα ura3 leu2 his3 lys2 nmd3::kanMX4 + p CEN TRP1 nmd3-2 + p CEN URA3 NMD3</i>	(Bassler et al., 2001)
HKY906	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ0 trp1::kanMX4 mtr2::kanMX4 + p CEN TRP1 mtr2-21 + p CEN URA3 MTR2</i>	Heike Krebber
HKY918	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 trp1::kanMX4 fun12::kanMX4 mtr2::kanMX4 + p CEN TRP1 mtr2-21 + p CEN URA3 MTR2</i>	Heike Krebber
HKY931	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 trp1::kanMX4</i>	Heike Krebber
HKY934	<i>MATα ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 npl3::kanMX4 trp1::kanMX4</i>	Heike Krebber



**Tabelle 5: Hefestämme (Fortsetzung)**

HKY947	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 hmt1::kanMX4</i>	Euroscarf, Frankfurt a. M.
HKY949	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 fun12::kanMX4</i>	Euroscarf
HKY990	<i>hmt1::kanMX4 fun12::kanMX4</i>	diese Arbeit
HKY991	<i>MATa rpl10::kanMX4 trp1::kanMX4</i> + <i>p CEN URA3 RPL10-GFP</i>	Heike Krebber
HKY994	<i>MATa rpl10::kanMX4 npl3::kanMX4 trp1::kanMX4</i> + <i>p CEN URA3 RPL10-GFP</i>	Heike Krebber
HKY1047	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 rio2::kanMX4</i> + <i>p CEN LEU2 rio2-1</i>	(Schäfer et al., 2003)
HKY1056	<i>MATa ura3 leu2 his3 lys2 trp1 fun12::kanMX4 rix1-1</i>	diese Arbeit
HKY1058	<i>MATa ura3 leu2 his3 lys2 trp1 fun12::kanMX4</i> <i>rio2::kanMX4 + p CEN LEU2 rio2-1</i>	diese Arbeit
HKY1243	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 lys2Δ0 rpl10::kanMX4</i> + <i>p CEN HIS3 rpl10(G161D)</i>	diese Arbeit

## 2.4 Plasmide

**Tabelle 6: Plasmide**

Plasmid nummer	Charakteristika	Quelle
pHK12	<i>CEN URA3 P<sub>ADH</sub>-NLS-NES-GFP-GFP</i>	(Taura et al., 1998)
pHK13	<i>2μ URA3 MTR10</i>	A.M. Tartakoff, Cleveland
pHK25	<i>CEN LEU2 NPL3</i>	Heike Krebber
pHK87	<i>CEN LEU2</i>	(Sikorski and Hieter, 1989)
pHK88	<i>CEN URA3</i>	(Sikorski and Hieter, 1989)
pHK103	<i>2μ LEU2</i>	(Christianson et al., 1992)
pHK104	<i>2μ URA3</i>	(Christianson et al., 1992)
pHK119	ampR GST(pGEX4T-1)	Pharmacia
pHK144	<i>2μ URA3 P<sub>GAL</sub>-GFP-NPL3</i>	(Lee et al., 1996)
pHK145	<i>2μ URA3 P<sub>GAL</sub>-GFP-C-NPL3 (139 aa)</i>	Heike Krebber
pHK154	<i>CEN LEU2 npl3-17</i>	(Lee et al., 1996)
pHK195	<i>2μ URA3 NPL3</i>	(Lee et al., 1996)
pHK230	<i>2μ URA3 P<sub>GAL</sub>-GFP</i>	(Lee et al., 1996)
pHK238	<i>CEN LEU2 NPL3-myc (myc inserted into the PmlI site of NPL3)</i>	Heike Krebber
pHK285	<i>2μ LEU2 MTR2</i>	(Santos-Rosa et al., 1998)
pHK391	<i>2μ TRP1 GAL4 DNA-BD</i>	Clontech
pHK392	<i>2μ LEU2 GAL4 AD</i>	Clontech
pHK418	<i>CEN LEU2 GFP-NPL3</i>	(Gilbert et al., 2001)
pHK598	<i>2μ LEU2 ADE3 NPL3</i>	Heike Krebber
pHK697	<i>CEN URA3 RPS2-GFP</i>	(Milkereit et al., 2003)
pHK698	<i>CEN URA3 RPL25-GFP</i>	(Gadal et al., 2001)
pHK718	<i>2μ ADE3 URA3 NMD3</i>	(Hedges et al., 2005)
pHK719	<i>2μ LEU2 NMD3</i>	(Hedges et al., 2005)
pHK747	<i>CEN URA3 RPL10-GFP</i>	Heike Krebber
pHK758	<i>CEN TRP1 rpl10(G161D)-GFP</i>	Heike Krebber
pHK763	<i>2μ TRP1 P<sub>ADH</sub>-GAL4-BD-NPL3</i>	diese Arbeit
pHK764	<i>2μ LEU2 P<sub>ADH</sub>-GAL4-AD-NPL3</i>	diese Arbeit
pHK765	<i>CEN URA3 GFP-NPL3</i>	(Hackmann et al., 2011)

**Tabelle 6: Plasmide (Fortsetzung)**

pHK777	<i>CEN LEU2 6xmyc-NPL3</i>	Heike Krebber
pHK805	<i>2μ LEU2 PADH:GAL4-AD-npl3ΔC (Δaa276-414)</i>	diese Arbeit
pHK806	<i>2μ LEU2 PADH:GAL4-AD-npl3ΔN (Δaa1-124)</i>	diese Arbeit
pHK809	<i>2μ LEU2 PADH:GAL4-AD-npl3ΔNΔC (Δaa1-113 &amp; Δaa276-414)</i>	diese Arbeit
pHK810	<i>2μ LEU2 PADH:GAL4-AD- npl3ΔNΔ1 (Δaa1-195)</i>	diese Arbeit
pHK829	<i>2μ LEU2 PADH-GAL4-AD-npl3Δ25 (Δaa390-414)</i>	diese Arbeit
pHK830	<i>2μ LEU2 P<sub>ADH</sub>-GAL4-AD-npl3Δ50 (Δaa365-414)</i>	diese Arbeit
pHK831	<i>2μ LEU2 P<sub>ADH</sub>-GAL4-AD-npl3Δ75 (Δaa340-414)</i>	diese Arbeit
pHK832	<i>2μ LEU2 P<sub>ADH</sub>-GAL4-AD-npl3Δ100 (Δaa315-414)</i>	diese Arbeit
pHK833	<i>2μ LEU2 P<sub>ADH</sub>-GAL4-AD-npl3Δ125 (Δaa290-414)</i>	diese Arbeit
pHK835	<i>CEN LEU2 npl3Δ50 (Δaa365-414)</i>	diese Arbeit
pHK836	<i>CEN LEU2 npl3Δ75 (Δaa340-414)</i>	diese Arbeit
pHK837	<i>CEN LEU2 npl3Δ100 (Δaa315-414)</i>	diese Arbeit
pHK838	<i>CEN LEU2 npl3Δ125 (Δaa290-414)</i>	diese Arbeit
pHK845	<i>6xHIS-NPL3</i>	(Hackmann et al., 2011)
pHK882	<i>CEN URA3 MTR10-GFP</i>	Heike Krebber
pHK1227	<i>2μ URA3 P<sub>GAL</sub>-GFP-NES-C-NPL3 (139 aa)</i>	diese Arbeit
pHK1234	<i>2μ URA3 FLAG-FUN12</i>	(Choi et al., 2000)
pHK1274	<i>CEN LEU2 NLS-npl3Δ100</i>	Heike Krebber
pHK1276	<i>GST-NPL3</i>	Heike Krebber
pHK1291	<i>CEN HIS3 rpl10(G161D)</i>	diese Arbeit
pHK1302	<i>2μ URA3 RPL10</i>	diese Arbeit
pHK1303	<i>CEN URA3 P<sub>ADH</sub>-GFP-NPL3</i>	diese Arbeit
pHK1304	<i>CEN URA3 P<sub>ADH</sub>-GFP-npl3Δ100</i>	diese Arbeit
pHK1305	<i>CEN URA3 P<sub>ADH</sub>-GFP-NLS-npl3Δ100</i>	diese Arbeit
pHK1321	<i>CEN URA3 N-GFP-NPL3</i>	diese Arbeit
pHK1322	<i>CEN LEU2 C-GFP-NPL3</i>	diese Arbeit

## 2.5 Kultivierung von Stämmen

Zur Herstellung von Festmedium wurde dem entsprechenden Flüssigmedium für *E. coli* 1,5% bzw. für Hefe 1,8% (w/v) Agar zugesetzt. Die Nährmedien autoklaviert und hitzelabile Komponenten wie Antibiotika wurden vor ihrer Verwendung sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium zugesetzt.

### 2.5.1 Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium (pH 7,5) (Sambrook et al., 1989)

- 1% (w/v) Pepton
- 0,5% (w/v) Hefeextrakt
- 1% (w/v) NaCl

2xYT Medium (pH7,0)

- 1,6% (w/v) Pepton
- 1% (w/v) Hefeextrakt
- 0,5% (w/v) NaCl

Zur Selektion von plasmidkodierten Resistenzen wurden die Medien durch Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml oder Kanamycin mit 20 µg/ml ergänzt. Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei 37 °C. Submerskulturen wurden mit Einzelkolonien von Agarplatten beimpft und in einem Schüttelinkubator bei 180 UpM bebrütet. Übernachtskulturen wurden mindestens 16 h inkubiert. Zelldichten wurden durch Trübungsmessung in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm.

## 2.5.2 Kultivierung von Hefe

### YPD-Medium (Rose et al., 1990)

1% (w/v) Hefeextrakt

2% (w/v) Pepton

2% (w/v) Glukose

### Nährstoff-Mangelmedium (Rose et al., 1990)

0,7% (w/v) *Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids*

0,2% (w/v) *Yeast synthetic dropout medium supplement*

2% (w/v) Glukose

Zur Selektion eines plasmid- oder genomlokalisierten Markergens, das eine Stoffwechselauxotrophie des Hefestammes komplementierte, wurde das Nährstoff-Mangelmedium so gewählt, dass es das Produkt des jeweiligen Stoffwechselweges nicht enthielt.

### FOA-Platten (Rose et al., 1990)

0,7% (w/v) *Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids*

0,2% (w/v) *Yeast synthetic dropout medium supplement*

0,1% (w/v) *5-Fluoroorotic acid*

2% (w/v) Glukose

1,8% (w/v) Agar

Das Medium wurde sterilfiltriert und dem Agar nach dem Autoklavieren zugesetzt. FOA-Platten konnten zur Selektion Uracil-auxotropher Zellen verwendet werden, da das Produkt des Gens URA3 5-Fluoroorotic acid zu der toxischen Substanz 5-Fluorouracil metabolisiert.

Sporulationsmedium (Rose et al., 1990)

Lösung 1:

0,5% (w/v) Hefeextrakt  
306 mM Kaliumacetat

Lösung 2:

5 mM Glukose  
0,4 mM Adenin  
0,7 mM Uracil  
0,4 mM Tyrosin  
0,2 mM Histidin  
0,3 mM Leucin  
0,2 mM Lysin  
0,2 mM Tryptophan  
0,3 mM Methionin  
0,2 mM Arginin  
1,2 mM Phenylalanin  
5,9 mM Threonin

Nach dem Autoklavieren von Lösung 1 und dem Sterilfiltrieren von Lösung 2 wurden beide Lösungen im Verhältnis 1:1 zusammengegeben.

Die verwendeten Hefestämme wurden standardmäßig bei 25°C kultiviert. Submerskulturen wurden mit Einzelkolonien von Agarplatten oder mit Teilen einer Vorkultur beimpft. Übernachtskulturen wurden in einem Schüttelinkubator bei 130 rpm bebrütet. Zelldichten wurden durch Auszählen in einem Hämazytometer oder durch Trübungsmessung in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Hefekulturen wurden in einer logarithmischen Wachstumsphase ( $1-3 \times 10^7$  Zellen/ml) geerntet, bei 4200 x g und 10 min zentrifugiert und für nachfolgende Experimente in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder frisch verwendet. Zur Induktion Galaktose-induzierbarer Promotoren wurden die Zellen bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase in Nährstoff-Mangelmedium bebrütet, welches 2%

(w/v) Raffinose anstelle von Glukose aufwies. Anschließend erfolgte die Induktion durch Zugabe von 2% (w/v) Galaktose.

## 2.6 Molekularbiologische Verfahren

### 2.6.1 Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA

Die Herstellung chemisch-kompetenter Zellen erfolgte im Wesentlichen nach Inoue *et al.* 1990. Ein Zellaliquot von 100 µl wurde auf Eis mit 1 pg-1 µg Plasmid-DNA bzw. dem gesamten Ligationsansatz für 30 min und anschließend für 2 min bei 42°C inkubiert. Den Zellen wurde danach sofort 1ml LB-Medium zugeführt und für 45 min bis 1,5 h bei 37°C bebrütet. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 2000 x g konnten die Zellen auf Selektivfestmedium aufgebracht werden.

### 2.6.2 Transformation von Hefe mit DNA

Die Transformation von Hefe wurde im Wesentlichen nach (Gietz et al., 1992) ausgeführt.

#### TE/Lithiumacetat (pH 7,5)

100 mM Lithiumacetat  
10 mM Tris/HCl  
1 mM EDTA

#### PEG/TE/Lithiumacetat (pH 7,5)

40% (v/v) PEG 4000  
100 mM Lithiumacetat  
10 mM Tris/HCl  
1 mM EDTA

Der Hefestamm wurde im entsprechenden Medium bei 25 °C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ( $1-3 \times 10^7$  Zellen/ml) kultiviert. Die Zellen wurden sedimentiert und mit 1 ml TE/Lithiumacetat gewaschen. Nach dem erneuten Aufnehmen des Zellpellets in TE/Lithiumacetat wurde die Zelldichte auf  $1 \times 10^9$  Zellen/ml eingestellt. 50 µl dieser Suspension wurden mit 1 µg Plasmid und 50 µg hitzedenaturierter Heringssperma-Träger-DNA vermischt. Nach Zugabe von 300 µl PEG/TE/Lithiumacetat

wurde die Probe für 30 min bei 25°C über Kopf rotiert. Nach dem anschließenden Hitzeschock für 15 min bei 42°C wurden die Zellen sedimentiert (1 min, 16100 × g) und in A. dest. resuspendiert und auf entsprechendem Selektivagar ausplattiert und bebrütet.

### **2.6.3 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe**

Chromosomale DNA aus Hefe wurde annähernd an (Rose et al., 1990) gewonnen.

#### Detergenz-Lyse-Puffer (pH 8,0)

10 mM Tris/HCl  
1 mM EDTA  
2 % (v/v) Triton X-100  
1 % (w/v) SDS  
100 mM NaCl

#### TE-Puffer (pH 8,0)

10 mM Tris/HCl  
1 mM EDTA

Hefezellen aus 10 ml einer Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation (5 min, 3.800 × g, RT) sedimentiert und der Überstand verworfen. Nach einmaligem Waschen mit 500 µl A. dest. wurden die Zellen in 50 µl A. dest. resuspendiert. Es folgte der Aufschluss der Hefezellen durch Zugabe von 200 µl Detergenz-Lyse-Puffer, 200 µl Phenol-Chloroform-Amylalkohol (25:24:1), 300 µl Glasperlen und vortexen mit der FastPrep Maschine bei 5 m/s für 25 s. Der Ansatz wurde mit 200 µl TE-Puffer vermischt und die Phasen durch Zentrifugation (5 min, 16100 × g, RT) separiert. Die wässrige, von Proteinresten befreite Oberphase wurde überführt und die chromosomale DNA durch Versetzen mit 6 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 1 ml Ethanol (abs.) als Ammoniumsalz gefällt. Das entstandene Präzipitat wurde sedimentiert (10 min, 16100 × g, RT), mit 70%-igem Ethanol gewaschen und bei RT luftgetrocknet. Im Anschluss wurde die chromosomale DNA in 50-100 µl TE-Puffer aufgenommen und bis zum späteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.



### 2.6.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefe

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus Hefezellen erfolgte mithilfe des Kits „NucleoSpin RNAII“ und der Herstellerangaben. Im Anschluss wurde die RNA in 50 µl DEPC-behandeltem A. dest. eluiert und bis zur späteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Konzentration der RNA wurde spektralphotometrisch ermittelt.

### 2.6.5 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative RT-PCR diente in dieser Arbeit für den Nachweis von gebundener RNA an immunopräzipitierten Proteinen, da man mit dieser Methode auch kleinere Unterschiede in der RNA-Bindung feststellen kann. Dazu wurden 250-500 ng co-präzipitierter RNA mit Random Hexamer-Primern und der Maxima Reverse Transkriptase mittels Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Als Kontrolle für die Amplifikation unspezifisch bindender RNAs an die Matrix während der Ko-Immunopräzipitation wurde der gesamte Überstand des Eluats für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die cDNA jeder Probe wurde anschließend 1:30000 oder verdünnt und jeweils 5 µl der Verdünnung in Triplikaten von 20 µl Reaktionsansätzen eingesetzt. Der GoTaq qPCR Master Mix enthielt bereits SYBR Green, DNA-Polymerase und Puffer. Als gewünschte Primer für die Analyse der 25S rRNA wurden HK653 (5'-CCTTAGTAACGGCGATGAAGCGG-3') und HK654 (5'-GGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGC-3') in einer Konzentration von je 0,1 µM eingesetzt. Die qRT-PCR wurde in einem Rotor Gene Q Gerät betrieben.

#### qRT-PCR Programm

	95°C	5 min	Initiale Denaturierung
45 Zyklen	95°C	5 s	Denaturierung
	61°C	10 s	Hybridisierung
	60°C	15 s	Elongation

Für die Auswertung wurde der ct-Wert der eigentlichen Probe von dem ct-Wert der Negativkontrolle abgezogen. Dieser Wert ergab den  $\Delta$ ct-Wert der Probe.

### 2.6.6 Dot-Blot-Analyse zur Detektion von poly(A<sup>+</sup>)-RNA

Die Proben extrahierter RNA wurden in gleichem Volumen von 10 µl auf eine Hybond N<sup>+</sup>-Nylonmembran getropft. und mithilfe eines UV-Stratalinker 2400 bei 254 nm und 120000 µJ/cm<sup>2</sup> fixiert. Die Membran wurde anschließend in Prähybridisierungslösung für 1 h bei 42°C vorinkubiert.

#### Prähybridisierungslösung

0,5 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,5)

7% SDS

1 mM EDTA

Für die Herstellung der Sonde wurden 250 ng bereits synthetisiertes Oligonukleotid (HK238 = oligo dT<sub>52</sub>) mit 100 µCi von radioaktivem γ-[P<sup>32</sup>]-ATP mit 10 U T4-Polynukleotidkinase für 1 h bei 37°C inkubiert. Dabei erfolgte die Übertragung des γ-Phosphat vom ATP auf die Hydroxylgruppe des dT<sub>52</sub> Oligonukleotids. Über eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 75°C für 10 min wurde die radioaktive Markierungsreaktion gestoppt. Nach der Präzipitation mit 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat, 20 µg Glykogen und 3 Volumen Ethanol bei -20°C über Nacht wurde die Sonde bei 16100 x g und 45 min pelletiert, gewaschen, getrocknet und in 100 µl DEPC-behandelten Wasser aufgenommen. Das gesamte Volumen der Sonde (100 µl) wurde in der Prähybridisierungslösung auf der Nylonmembran über Nacht bei 42°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mit 2x SSC, danach mit 1x SSC je 15 min bei RT und anschließend mit 0,5x SSC für 15 min bei 42°C gewaschen.

#### 20x SSC (pH 7,0)

3 M NaCl

0,3 M Na-Citrat

Schlussendlich wurden Signale auf der Membran mit dem PhosphorImager detektiert und ausgewertet.

## 2.7 Zellbiologische Methoden mit Hefe

### 2.7.1 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von poly(A<sup>+</sup>)-RNA

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ist ein Verfahren, um Nukleinsäuren, wie RNA oder DNA, in Geweben oder in einzelnen Zellen, mit Hilfe einer Sonde, die über Basenpaarung an die spezifische Nukleinsäure bindet, nachzuweisen. Für die FISH von poly(A<sup>+</sup>)-RNA wurden Hefezellen verwendet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden ( $1-3 \times 10^7$  Zellen/mL). Je nach temperatursensitiven Phänotyp wurden die Kulturen der jeweiligen nichttolerierbaren Temperatur ausgesetzt. Die Zellen wurden durch Zugabe von 37% (v/v) Formaldehyd auf eine Endkonzentration von 2,6% (v/v) fixiert und schwenkend für 30-60 min bei der gleichen Temperatur inkubiert. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (4200 x g, 3 min). Anschließend wurden das Pellet zweimal mit 1 mL P-Lösung gewaschen und entsprechend der Zellmenge in 100-500 µl P-Lösung aufgenommen.

#### P-Lösung

1,2 M Sorbitol

0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,5)

Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurden 100 µl der Zellsuspension mit 10 mM DTT inkubiert (10 min, RT) und anschließend die Zellwand durch Zugabe von 1-10 U Zymolase enzymatisch aufgelöst. Die enzymatische Reaktion wurde im Phasenkontrastmikroskop verfolgt, bis ein gewisser Anteil der Hefezellen (50-75%) Sphäroplasten bildeten und einen dunklen Kontrast erhielten. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert ( $16.100 \times g$ , 10 s, RT), einmal mit P-Lösung gewaschen und danach in einem angemessenen Volumen P-Lösung resuspendiert. Üblicherweise sollte eine hohe Zelldichte eingestellt werden, da die Anzahl der darauffolgenden Waschschrte die Zellzahl auf dem Objektträger stark minimieren kann. Währenddessen wurde der Objektträger mit Poly-L-Lysin behandelt (0,3% (w/v) Poly-L-Lysin, 5-15 min, RT), mit A. dest gespült und sofort feucht oder luftgetrocknet benutzt. Anschließend wurden 25 µl der Zellsuspension auf einen teflonbeschichteten 12-well-Objektträger gegeben und für 5-10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit P-Lösung und 0,5% (v/v)

Triton X-100 permeabilisiert (10 min, RT) und einmal kurz mit P-Lösung gewaschen. Nachdem die Zellen mit 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) äquilibriert wurden (2 min, RT) folgte eine Inkubation mit 0,25% (v/v) Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) (10 min, RT), wodurch die polaren Gruppen der Proteine blockiert wurden. Nach der Prähybridisierung der Proben mit Hybridisierungspuffer für 1-2 h bei 37°C wurde die Cy3-gekoppelte oligo-dT<sub>50</sub>-Sonde mit einer Verdünnung von ca. 1:500 zugesetzt. Die Hybridisierung der Proben erfolgte über Nacht (12-16 h) bei 37°C.

#### Hybridisierungs-Puffer

50% (v/v) deionisiertes Formamid  
4× SSC (pH 7,0)  
1× Dendhardts-Lösung  
125 µg/mL tRNA (10 mg/mL)  
10% (w/v) Dextransulfat

#### 50× Dendhardts-Lösung

1% (w/v) Ficoll  
1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon  
1% (w/v) BSA

Anschließend wurden die Zellen kurz mit 2× SSC und danach für 60 min bei RT mit 2× SSC inkubiert. Danach folgten Waschschrte mit herabgesetzter Salzkonzentration (1× SSC (60 min, RT), 1× SSC (30 min, 37°C), 0,5× SSC (30 min, RT).

#### 20x SSC (pH 7,0)

3 M NaCl  
0,3 M Na-Citrat

Anschließend wurden die Hefezellen mit Aby-Waschlösung 1 (1 min, RT) und mit Aby-Waschlösung 2 (5 min, RT) gewaschen und die DNA mit DAPI (0,3 µM in Aby-Waschlösung 2) gefärbt (2-5 min, RT).

Aby-Waschlösung 1

0,1 M Tris/HCl (pH 9,0)

0,15 M NaCl

Aby-Waschlösung 2

0,1 M Tris/HCl (pH 9,5)

0,1 M NaCl

Es folgten drei weitere Waschschr tte mit Aby-Waschlösung 2 für jeweils 5 min bei RT. Danach wurde der Objektträger im Dunkeln getrocknet und abschließend in Mounting-Lösung eingebettet.

Mounting-Lösung

2% (w/v) n-Propyl-Gallat

80% (v/v) Glycerol (100% (v/v))

in PBS (pH 8,0)

Für eine Langzeitlagerung bei -20 C wird das Versiegeln mit klarem Nagellack empfohlen.

**2.7.2 Immunfluoreszenz-Färbung**Antikörper-Blockierungspuffer

0,1 M Tris/HCl (pH 9,0)

0,15 M NaCl

5% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS

0,3% (v/v) Triton X-100

Die Immunfluoreszenz dient der *in-situ*-Analyse von Proteinen und damit ihre lokale Verteilung in einer Zelle. Die Herstellung und Fixierung der Proben sowie die enzymatische Lyse der Zellwand vor dem Aufbringen der Zellen auf einen Objektträger erfolgten wie bei der FISH ( 2.7.1). Im Anschluss an die Permeabilisierung der Zellmembran mit Triton X-100 wurden die Zellen für 30 min bis 1 h bei RT mit Antikörper-Blockierungspuffer inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren. Der Erstantikörper wurde in Antikörper-Blockierungspuffer verdünnt (Anti-Npl3 1:500), auf

die Zellen gegeben und über Nacht (12-16 h) bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Überschüssige Antikörpermoleküle wurden durch einen kurzen Waschschrift mit Aby-Waschlösung 1 (1 min, RT) sowie aufeinanderfolgende Waschschriffe für 10 min und 30 min mit Aby-Waschlösung 1 bei RT und für 10 min und 30 min mit Aby-Waschlösung 2 bei RT entfernt. Anschließend wurde der Fluoreszenz-markierte Zweitantikörper (IgG AlexaFluor®488 mit Verdünnung 1:200) in Blockierungspuffer für 2 h bei RT auf den Zellen inkubiert. Nach dieser Behandlung folgten die gleichen Waschschriffe wie oben beschrieben und eine zusätzliche Färbung der DNA mit DAPI und Einbettung in Mounting-Lösung ( 2.7.1).

### **2.7.3 GFP-Mikroskopie**

Anzucht, Ernte und Fixierung der Zellen erfolgte in GFP-Mikroskopie-Studien genauso wie in 2.7.1 beschrieben, nur mit einer Änderung der Fixierdauer. Um die fluoreszierende Struktur von GFP zu erhalten wurden die Zellen nicht zusätzlich inkubiert sondern sofort nach Zugabe von Formaldehyd pelletiert und in P-Lösung gewaschen. In GFP-Mikroskopie-Studien sollte die Zellsuspension eine deutlich geringere Zelldichte aufweisen (milchig trüb), da in dieser Methode weniger Waschschriffe zum Einsatz kommen. Die Behandlung und Beladung des Objektträgers erfolgte wie in 2.7.1 erläutert. Nach der Behandlung mit Triton wurden die Zellen mit P-Lösung und Aby-Waschlösung 2 gewaschen und die DNA-Färbung mit DAPI durchgeführt.

### **2.7.4 Radioaktive Markierung von Proteinen zur Bestimmung der Proteinneusynthese in vivo**

Zur Bestimmung der Translationsrate und Neusynthese von Proteinen wurden Hefezellen mit radioaktiv-markiertem Methionin und Cystein inkubiert, die in die Proteine während der Translation eingebaut wurden. Diese markierten und neusynthetisierten Proteine wurden im Anschluss über Autoradiographie detektiert. Dazu wurden Hefezellen in Methionin-Mangelmedium, bei 25°C kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase ( $1-3 \times 10^7$  Zellen/mL) zentrifugiert ( $4200 \times g$ , 3 min), in 1 ml frischem Medium resuspendiert und in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit einem Schraubverschluss überführt. Nach einer Vorinkubation bei der für einige Mutanten restriktiven Temperatur wurde die Zellsuspension mit 200 µCi radioaktiv-markiertem

[<sup>35</sup>S]-Methionin und -Cystein für 10 min inkubiert. Nach der Zentrifugation (16.100 × g, 2 min, RT) wurden die Zellen zweimal mit 1 ml A. dest. gewaschen und anschließend in 200 µl PBS aufgenommen und mit 100 µl Glassperlen und 10 µl Proteaseinhibitor-Mix (Roche) mit der FastPrep24 bei 5 m/s und 30 s aufgeschlossen. Nach dem Pelletieren der Zelltrümmer (16100 × g, 5 min) wurde der Proteingehalt mit den Lösungen von BioRad (RC DC Protein Assay) bestimmt und gleiche Proteinmengen jeden Stammes (ca. 60-100 µg) mittels SDS-PAGE auf einem 10%-iges PAA-Gel aufgetrennt. Um die Beladung nach dem Gellauf zu kontrollieren, wurde anschließend eine Coomassie-Färbung durchgeführt (2.8.7). Abschließend wurde das Gel mit einer Gel-Trocknungsanlage bei 80°C für 1,5 h auf Filterpapier getrocknet und die radioaktiv-markierten Proteine durch Autoradiographie mit Hilfe des PhosphorImager System oder durch Röntgenfilm detektiert. Die entstandenen Signale konnten durch Verwendung der Software Image Gauge 3.1 quantifiziert werden.

## **2.8 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.8.1 Herstellung von Zelllysaten**

Für die Herstellung von Zelllysaten aus Hefe wurde eine beliebige Menge Zellpellet gewonnen und dieses je nach Größe bis 500 µl in ein 2 ml-Schraubdeckelgefäß oder über 500 µl in ein 15 ml-Falkon überführt. Für den Aufschluss wurden alle nächstfolgenden Schritte penibel auf Eis ausgeführt. Dem Zellpellet wurde das gleiche Volumen des für den jeweiligen Assay-spezifischen Puffers und 1 Volumen Glasperlen zugefügt. Um den verstärkten Proteinabbau während des Aufschlusses von Hefe zu verhindern, wurden zweierlei Proteaseinhibitor-Mischungen (von Roche bzw. Sigma, jeweils 5 µl zu 100 µl Zellpellet) hinzugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden dann mit der FastPrep-Maschine mit 5 bis 6 m/s für 25 s gevortext. Gegebenenfalls wurde dieser Schritt 2-3mal wiederholt. Der entstandene Proteinüberstand wurde besonders für den darauffolgenden Einsatz in Ko-Immunopräzipitationen mit mehrmaligem Reaktionsgefäßwechsel zentrifugiert (dreimal 10 min, 16100 × g, 4°C).

Bakterien wurden mit einem Sonifizierer aufgeschlossen. Das Bakterienpellet (ca. 1 g Feuchtwicht) wurde in einem 50 ml Falkon in rund 3 ml des gewünschten Puffers resuspendiert und mit einer mittelgroßen Spatelspitze pulverisiertem Lysozym für 30 min

auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in einem Eisbad unter der Vermeidung von Schaumbildung solange sonifiziert bis die Suspension ihre Trübung verlor. Der Proteinüberstand wurde auch mit mehrmaligem Gefäßwechsel bei voller Zentrifugationskraft und 4°C geklärt und für darauffolgende Experimente vorbereitet.

### **2.8.2 Ko-Immunopräzipitation zur Analyse von Protein-Protein und Protein-RNA Interaktionen**

Zelllysate aus Hefezellen wurden, wie unter 2.8.1 beschrieben, gewonnen. Das Zellvolumen richtete sich nach der Expression und damit der Ausbeute des gewünschten Proteins, daß immunopräzipitiert werden sollte. Für Protein-Protein-Interaktionsstudien wurde, wenn nicht anders angegeben, standardmäßig PBSKMT-Puffer verwendet. Für vorwiegend zytoplasmatische Proteininteraktionen wurde die Triton-Konzentration 0,1%-ig gewählt. Für Membran-assoziierte Interaktionen konnte die Triton-Konzentration auf 0,5% erhöht werden.

#### 1x PBS (pH 7,4)

137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### PBSKMT-Puffer

1x PBS  
3 mM KCl  
2,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1 % (v/v) Triton X-100

Da einige spezifische Primärantikörper zur direkten wildtypischen Proteinerkennung in Ko-Immunopräzipitationen (IP) minderwertige Ergebnisse erbrachten, wurden vorwiegend für diese Experimente etablierte Antikörper, die gegen einen Fusionstag gerichtet sind, verwendet. Je nach Markierung des gewünschten Proteins wurde für GFP der Anti-GFP-Antikörper aus Kaninchen und für myc der Anti-myc-Antikörper aus Maus verwendet. Jeweils 2 µg des Antikörpers wurden mit 10 µl ProteinG-Sepharose (50%-ige



Suspension) den Proteinlysaten zugesetzt und für 4 h bei 4°C drehend inkubiert. Eine weitere Agenz, namens GFP-Trap\_A, stand für die IP von GFP-getaggtten Proteinen zur Verfügung. Bei dieser Art von Agarose sind die Anti-GFP-Antikörper aus Alpaka bereits an den Beads gekoppelt. Von dieser 50%-igen Suspension wurden 10 µl pro Reaktion verwendet.

Nach der Rotation für 4 h bei 4°C wurden die Beads in den Reaktionsansätzen fünfmal mit 1-2 ml PBSKMT-Puffer über Kopf drehend gewaschen und jeweils bei 2000 x g für 2 min pelletiert. Anschließend wurden die Beads in SDS-Probenpuffer (2.8.6) aufgenommen und die Proteine mit 5 min bei 95°C eluiert. Anschließend wurden die Proben für die SDS-PAGE benutzt.

Speziell für Protein-RNA-Interaktionsstudien wurde die GFP-Trap-Agarose und der RNA-IP-Puffer verwendet.

#### RNA-IP-Puffer

25 mM Tris-HCl (pH 7.5)

100 mM KCl

0,2% (v/v) Triton X-100

0,2 mM PMSF

5 mM DTT

Zusätzlich zu Proteaseinhibitoren wurde den Zelllysaten noch ein RNase-Inhibitor (RiboLock) beigelegt. Die Lysate wurden vor der Ko-Immunopräzipitation mit DNaseI mit einer Endkonzentration von 10 U/ml für 30 min bei 30°C behandelt. Nach der Inkubation und dem Waschen mit RNA-IP-Puffer ( oben) wurden die Beads in zwei Fraktionen geteilt. Ein Zehntel der Beads wurde für die Analyse mittels SDS-PAGE in SDS-Proben-Puffer aufgenommen, der andere Teil der Beads wurde mit Proteinase K bei 37°C für 30 min behandelt und anschließend mit einer Phenol-Chloroform-Mischung gevortext. Danach wurde der Überstand noch einmal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die wässrige, RNA-haltige Phase wurde mit 0,1 Volumen 1M LiCl, 0,9 Volumen Ethanol und 20 µg Glykogen versetzt, über Nacht bei -20°C präzipitiert und pelletiert (16100 x g, 45 min, 4°C). Letztlich wurde das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen und bei 55°C 2-3 min getrocknet, bevor die RNA in 10 µl RNase-freiem Wasser gelöst wurde. Die so ko-immunopräzipitierte

RNA wurde entweder in einer Dot-Blot-Analyse verwendet, oder in der qRT-PCR eingesetzt.

### **2.8.3 Affinitätsreinigung heterolog exprimierter Proteine für Interaktionsstudien**

Für die Analyse, ob Npl3-Moleküle ohne weitere Faktoren aus Hefe miteinander interagieren können, wurden die in *E. coli* exprimierbaren Konstrukte *GST-NPL3* und *His-NPL3* verwendet. His-Npl3 wurde wie in (Hackmann et al., 2011) beschrieben aufgereinigt. Die Expression des Konstrukts GST-NPL3 wurde in dem *E. coli* Stamm *BL21DE3* unter Zugabe von 1 mM IPTG bei 16°C über Nacht induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4400 rpm, 10 min) geerntet und in 50 ml Falkons überführt. Circa 1 ml Zellpellet wurde durch Sonifizieren in Binde-Puffer aufgeschlossen ( 2.8.1)

#### Binde-Puffer

20 mM HEPES  
5% Glycerin  
100 mM NaCl  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,14% (v/v) 2-Beta-mercaptoethanol  
1mM PMSF

Für die Affinitätsreinigung von GST-Npl3 wurde Glutathion-Sepharose 4B benutzt. Da die Sepharose starke unspezifische Bindungen mit nicht GST-haltiger Proteine aufwies, wurde die Matrix vor dem eigentlichen Experimentansatz mit bakteriellem Lysat aus *BL21DE3* für 4 h bei 4°C inkubiert und dadurch freie Bindungsstellen blockiert. Danach wurden 15 µl Sepharose von 50%-iger Suspension mit dem GST-Npl3 enthaltenem Bakterienlysate und 45 µg aufgereinigtes His-Npl3 gemischt und für 2 h bei 4°C drehend inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Reaktionsansatz mit GST und His-Npl3 mitgeführt. Alle Lysate enthielten 200 µg/ml RNaseA um eine RNA-vermittelte Interaktion zwischen Npl3-Molekülen auszuschließen. Die Reaktionsansätze wurden sechsmal mit Binde-Puffer gewaschen, bevor die Protein durch Zugabe von SDS-Proben-Puffer und erhitzen eluiert wurden.

---

## 2.8.4 Separierung von Ribosomen mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Hefezellen wurden bei den gewünschten Temperaturen in logarithmischer Phase angezogen. Vor der Ernte wurde Cycloheximid in einer finalen Konzentration von 100 µg/ml der Kultur zugegeben und bei der Anzuchttemperatur oder auf Eiswasser 15 min inkubiert. Die Prozedur zur Herstellung von Zelllysaten in Gradientenlyse-Puffer erfolgte im Wesentlichen wie in 2.8.1 beschrieben, nur ohne Zugabe von Proteaseinhibitoren. Speziell der Zusatz des DMSO-haltigen Proteaseinhibitors von Sigma-Aldrich erzielte erfahrungsgemäß in der schlussendlichen Absorptionsmessung schlechte Ergebnisse.

### Gradientenlyse-Puffer

20 mM Tris-HCl (pH 7,5)  
20 mM KCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
12 mM Beta-Mercaptoethanol  
100 µg/ml Cycloheximid

Die linearen 12 ml Saccharosegradienten wurden erst mithilfe des Dichtegradientenfractionierungssystems, später mithilfe des Gradient Master-Geräts in Polyallomer-Röhrchen gegossen. Je nach Auftrennungsgrad der Ribosomen kann ein 4-55%-iger Gradient eingesetzt werden. Standardmäßig in dieser Arbeit wurden für die niedrigkonzentrierte 7% und für die hochprozentige Lösung 47% Saccharose verwendet. Diese wurden dann in den Apparaturen zusammen zum linearen Gradienten vermischt und auf Eis in den Zentrifugeneinsätzen vorgekühlt.

### Saccharosegradienten-Puffer

20 mM Tris-HCl (pH 7,5)  
20 mM KCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
Entweder 7% (w/v) oder 47% (w/v) Saccharose

Um alle Gradientenröhrchen mit gleicher Menge Zelllysate zu beladen, wurde eine Absorptionsmessung mit dem Nanodrop-Gerät bei 260 nm durchgeführt. Danach wurden

je Stamm 15 Units des Lysats auf den Saccharosegradienten gegeben und bei 287000 x g für 2,5 h in einem TH-641 Rotor in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Für die Bestimmung der Menge an ribosomalen Untereinheiten wurde 7 Units Zelllysats vor dem Beladen der Röhrrchen mit 100 mM EDTA 30 min auf Eis vorinkubiert, um 80 S-Partikel zu dissoziieren. Die Trennung der Untereinheiten erfolgte bei gleicher Geschwindigkeit, aber bei einer verlängerten Zentrifugationszeit von 3,5 h. Nach der Zentrifugation wurden die Gradientenproben mithilfe des Dichtegradientenfraktionssystems und dem Einpumpen von 60%-iger Saccharoselösung bei einer Geschwindigkeit von 20% in ca. 600 µl fraktioniert und aufgefangen. Dabei wurde kontinuierlich ein Spektrogramm bei 254 nm aufgenommen. Die Fraktionen des Gradienten konnten für weitere Experimente genutzt werden, z. Bsp. Analyse der enthaltenen Proteine über eine Fällung.

#### **2.8.5 Fällung von Proteinen**

Um Proteine aus wässrigen Lösungen zu präzipitieren wurde 1 Volumen 20%-ige Trichloressigsäure (w/v) zugegeben, gut gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde bei 16100 x g und 10 min pelletiert. Um Reste der Säure zu entfernen, wurde das Pellet zweimal mit 80%-igem Aceton (v/v) gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Um die Proteine großer Pellets wieder in Lösung zu bringen, wurde mindestens 50 µl SDS-Proben-Puffer hinzugegeben und die Proben in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß-Schüttler 10 min gevortext.

#### **2.8.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet. Das SDS-Gel besteht aus einem 5%-igen Sammelgel und standardmäßig 10%-igen Trenngel.

Sammelgel (5%)

16,7% (v/v) Rotiphorese Gel 30  
125 mM Tris/HCl (pH 6,8)  
0,1% (w/v) SDS  
0,1% (w/v) APS  
0,1% (v/v) TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)

Trenngel (10%)

33% (v/v) Rotiphorese Gel 30  
375 mM Tris/HCl (pH 8,8)  
0,1% (w/v) SDS  
0,1% (w/v) APS  
0,05% (v/v) TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)

Für die Probenaufbereitung wurden ca. 100 µg Proteinlysate oder Reaktionsansätze aus IP-Experimenten mit SDS-Proben-Puffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert.

SDS-Probenpuffer (3 x)

300 mM Tris/HCl (pH 6,8)  
30% (v/v) Glycerin  
6% (w/v) SDS  
5% (v/v) Beta-Mercaptoethanol  
0,02% (w/v) Bromphenolblau  
Für 1x SDS-Proben-Puffer zusätzlich 5% (v/v) Beta-Mercaptoethanol.

Die zu analysierenden Proben wurden zusammen mit Protein-Größenstandards (Unstained oder Prestained Protein Ladder) in die Geltaschen des SDS-Gels geladen. Das Proben wurden anschließend in einer mit SDS-Elektrophorese-Puffer gefüllten Apparatur bei 25 mA im Sammelgel und 35 mA im Trenngel aufgetrennt.

SDS-Elektrophorese-Puffer

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0,1% (w/v) SDS

**2.8.7 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen**

Für Expressionskontrollen in heterologen Systemen und für die Kontrolle der gleichen Proteinbeladung wurden die SDS-Gele mit Coomassie gefärbt. Dafür wurden die Gele 30 min in Fixierer geschwenkt und anschließend für 10 min mit der Färbelösung inkubiert.

Fixierer

50% (v/v) Methanol  
10% (v/v) Eisessig

Färbelösung

50% (v/v) Methanol  
0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R 250 (muss sich erst in  
Methanol lösen)  
10% (v/v) Eisessig

Nach der Färbung wurde das Gel mit Entfärber bedeckt und für 10-15 min geschwenkt. Zur schnelleren Entfärbung konnte der Gelschale noch ein Zellulosepaper beigelegt werden. Außerdem bestand die Option das Gel in Entfärber in der Mikrowelle kurz zu erhitzen.

### Entfärber

5% (v/v) Methanol

7% (v/v) Eisessig

### **2.8.8 Westernblot**

Für die Immundetektion von Proteinen mit Chemilumineszenz werden diese üblicherweise nach der Trennung mithilfe der SDS-PAGE auf eine Membran elektrophoretisch übertragen. Dazu wurde hier die Semi-Dry-Blot-Methode verwendet. Eine Schicht aus zwei Lagen Filterpapier (Dicke: 3 mm), die Nitrozellulose-Membran, das SDS-Gel und wieder zwei Lagen Filterpapier wurden in Blotpuffer genässt und in dieser Reihenfolge auf die Anodenfläche der Blot-Apparatur luftblasenfrei gelegt. Danach wurde die Kathodenplatte aufgelegt und mit Schrauben fest verschlossen.

### Blotpuffer

25 mM Tris-Base (pH 8,3)

192 mM Glycin

10% (v/v) Methanol

Nach 1,5 h bei 1 mA/ cm<sup>2</sup> Gel- bzw. Filterpapierfläche wurde die Membran in Ponceaulösung ca. 5 min gefärbt mit A. dest entfärbt und die Proteinbeladung sowie die Gleichmäßigkeit des Blotverfahrens kontrolliert. Eventuell wurde der nun sichtbare Größenstandard auf der Membran gekennzeichnet.

### Ponceaulösung

5% (v/v) Eisessig

0,25% (W/v) Ponceau S

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran ca. 1 h mit 5% (w/v) Milchpulverlösung in TBS inkubiert. Zum Nachweis der Proteine von Interesse wurde die Membran mit dem gewünschten primären Antikörper in 2%-iger Milchpulverlösung in TBST bei 4°C über Nacht schwenkend inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran nach 3 Waschschritten zu je 5 min mit TBST mit dem jeweiligen HRP-konjugierten Sekundärantikörper für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren 3

Waschschritten wurde eine Immundetektion durch Chemilumineszenz mit einem ECL-Kit durchgeführt.

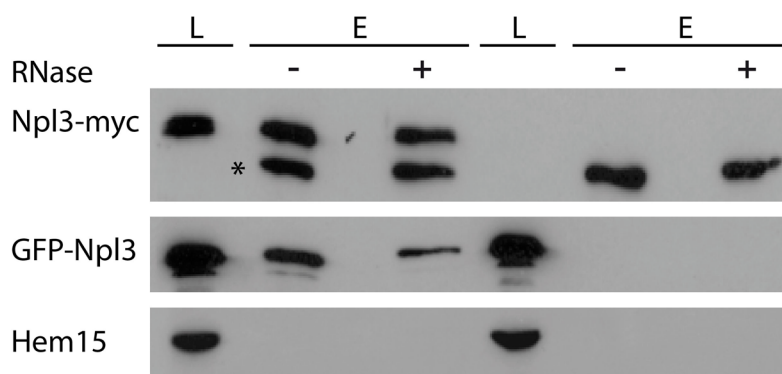


### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die Npl3-Npl3-Interaktionsdomäne ist essentiell für die Überlebensfähigkeit von Zellen

##### 3.1.1 Die Interaktion zwischen Npl3-Proteinen ist unabhängig von anderen Faktoren

Eine Assoziation zwischen Npl3-Molekülen wurde bereits in der Literatur beschrieben (Yu et al., 2004), jedoch zeigten die Autoren keine unabhängige Npl3-Interaktion von anderen Strukturen, wie mRNA oder anderen Proteinen. Um die Natur der Npl3-Npl3-Interaktion eingehender zu bestimmen, wurde eine Ko-Immunopräzipitation zuerst *in vivo* vorgenommen. Dabei wurden Wildtypzellen in der logarithmischen Phase geerntet, aufgeschlossen und unter Zugabe von RNase A (200 µg/ml) Npl3-myc immunopräzipitiert. Der myc-Tag dieses Fusionskonstrukts wurde nicht direkt 3'-endig, sondern in die *PmII*-Schnittstelle von *NPL3* integriert (pHK238).



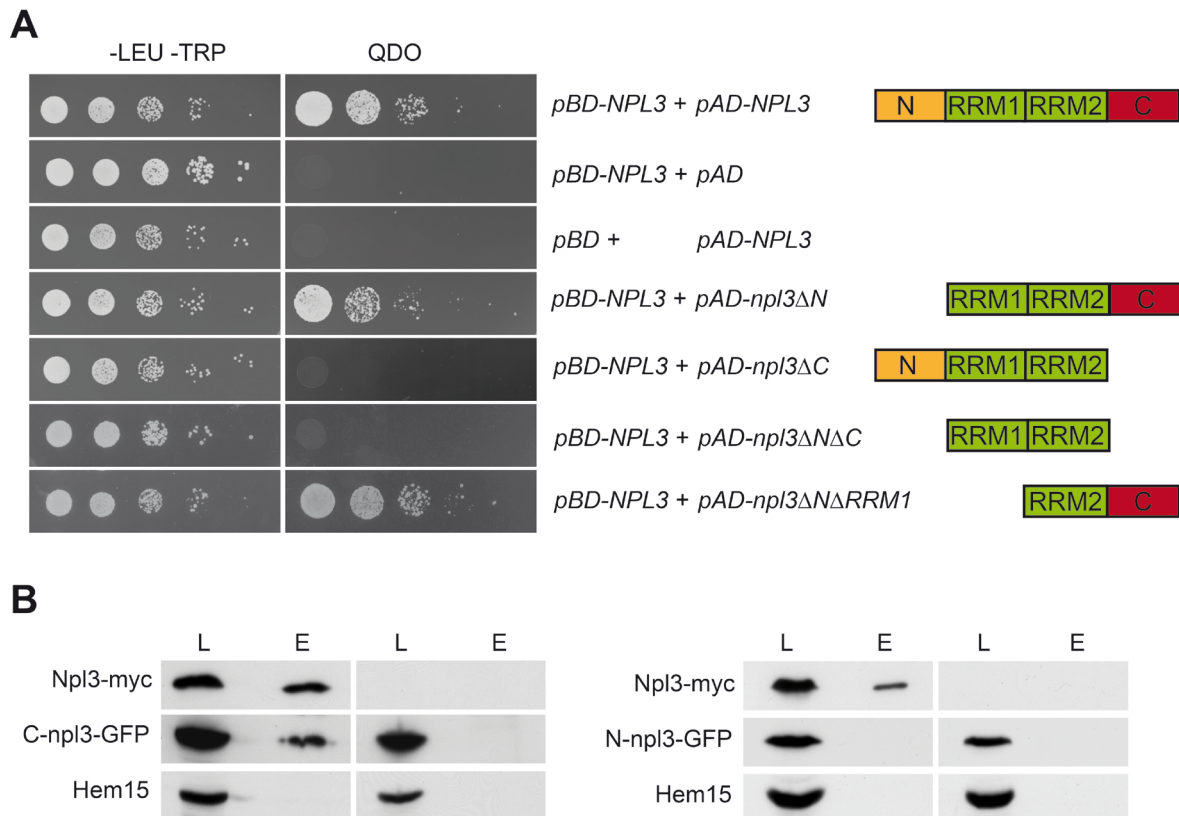
**Abbildung 5: Die physikalische Interaktion von Npl3-Molekülen ist nicht von einzelsträngiger RNA abhängig.** Interaktion *in vivo*. Western Blot Signale zeigen eine RNase-insensitive Interaktion von GFP-Npl3 mit Npl3-myc im wildtypischen Stammhintergrund, wobei Npl3-myc immunopräzipitiert wurde. Rechts ist die Kontrolle ohne Npl3-myc dargestellt. Eine weitere Kontrolle stellt die Detektion von Hem15 als unspezifischen Interaktionspartner dar. (\*= unspezifisches Signal)

Die Abbildung 5 verdeutlicht eine RNase-insensitive Interaktion von Npl3-myc mit GFP-Npl3. Da Npl3 ein wichtiger 60S- und mRNA-Transportfaktor ist (Hackmann et al., 2011; Lee et al., 1996), kann durch die Zerstörung von einzelsträngiger RNA während der

Reaktion die Verbindung der Npl3-Moleküle über mRNA ausgeschlossen werden. Trotzdem kann mithilfe dieses Experiments keine Aussage über doppelsträngige RNA-Strukturen, wie in 60S-Ribosomen zu finden, oder andere Adapterproteine, die die Interaktion vermitteln könnten, getroffen werden. Um Hefe-spezifische Faktoren auszuschließen, wurde auch der Organismus *E. coli* (BL21DE3) als heterologes Expressionssystem genutzt. GST-Npl3 wurde in dem Bakterienstamm exprimiert, die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und mit aufgereinigtem His-Npl3 inkubiert. Über die Affinitätsreinigung von GST-Npl3 mit Glutathion-Sepharose während RNaseA-Zugabe konnte His-Npl3 als positiver Interaktionspartner identifiziert werden (Diplomarbeit Frederik Hinz, AG Krebber). Dass die Interaktion nicht unspezifisch über den großen Affinitäts-Tag GST vermittelt war, wurde durch den Reaktionsansatz mit unfusioniertem GST und His-Npl3 kontrolliert. In diesem Eluat ist kaum ein Signal von His-Npl3 zu erkennen. Durch den erneuten Einsatz von RNase A konnte auch hier die Bindung über Einzelstrang-RNA vermieden werden. Das *in vivo* und *in vitro* Ergebnis in beweist demnach eine Interaktion von Npl3-Proteinen, die keine weiteren Strukturen wie mRNA oder Proteine benötigt.

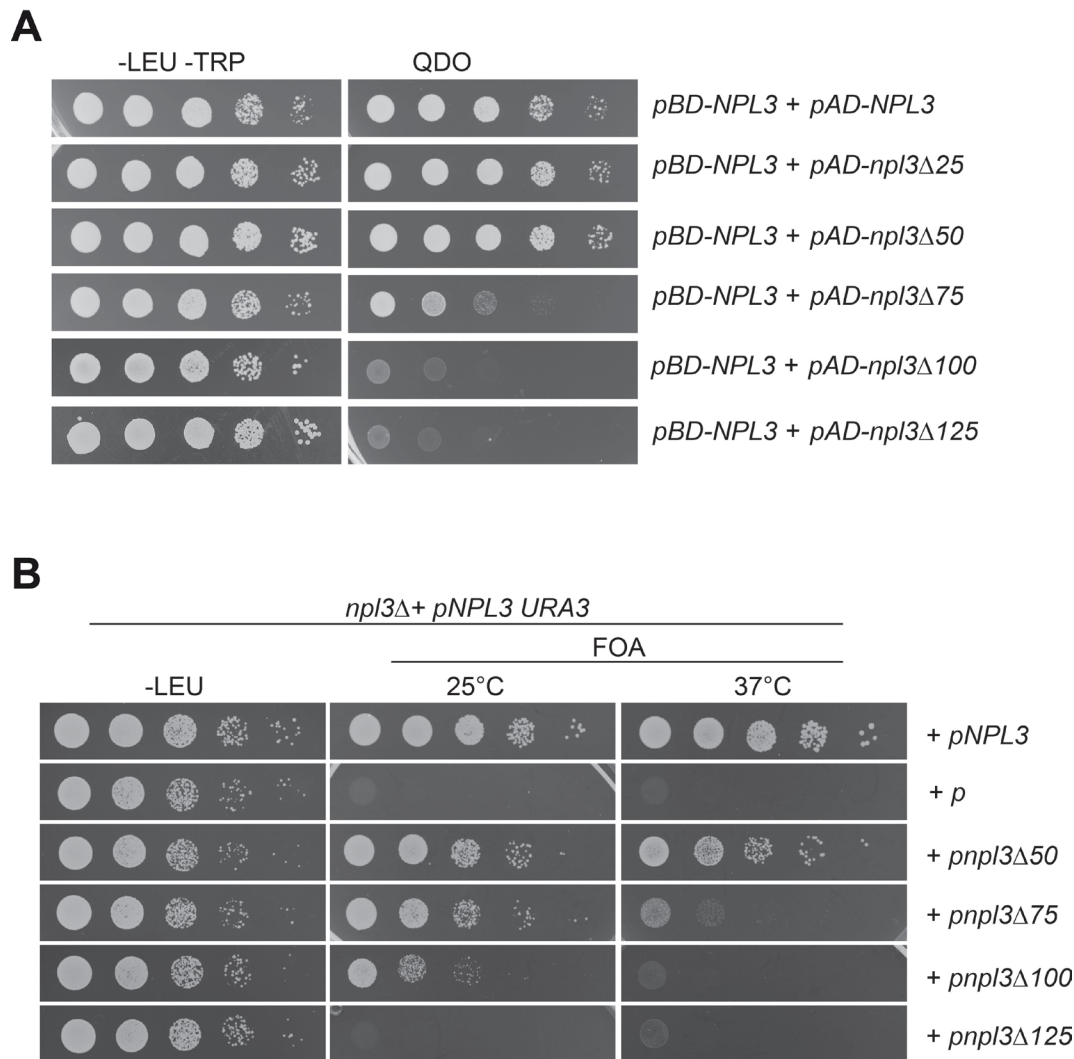
### **3.1.2 Die minimale Interaktionsdomäne von Npl3-Molekülen liegt im C-Terminus und ist essentiell**

Um die verantwortliche Domäne für die Interaktion von Npl3-Molekülen zu bestimmen, wurden Yeast-Two-Hybrid-Analysen durchgeführt, in denen um ganze Domänen verkürzte *NPL3*-Konstrukte mit einem wildtypischen *NPL3* im Stamm HKY265 exprimiert wurden (Abbildung 6A). Die Transkriptionsaktivierung der Markergene und somit Wachstum auf dem Vierfach-Selektionsmedium (QDO) wird als positive Interaktion gedeutet. Die Analyse ergab, daß das Wachstum auf dem Selektivmedium von der C-Domäne von Npl3 abhängig ist. Nur wenn beide eingebrachte Vektoren die Sequenz für den C-Terminus enthielten, konnte auch ein Wachstum auf QDO-Platten beobachtet werden. Daß die C-Domäne ausreichend für eine Interaktion mit Npl3 ist, zeigt die Ko-Immunopräzipitation in Abbildung 6B. In dieser wurde wildtypisches Npl3-myc präzipitiert und auf Interaktion mit dem C- oder N-Terminus von Npl3 untersucht. Durch die Zugabe von RNase kann eine Verbindung der Proteine über einzelsträngige RNA-Strukturen ausgeschlossen werden.



**Abbildung 6: Der C-Terminus von Npl3 vermittelt die Interaktion von Npl3-Molekülen. (A)** Verkürzte Versionen von Npl3 wurden mittels Yeast-Two-Hybrid-Analyse auf Interaktion mit dem Volllängenprotein untersucht. Das Wachstum von Zellen, die Konstrukte mit enthaltener C-Domäne tragen, auf Vierfach-Selektivplatten (QDO) zeigt eine positive Interaktion. Die aufgebrachte Zellmenge wurde auf -LEU -TRP-Platten kontrolliert. Rechts ist die Verkürzung von Npl3 schematisch dargestellt. (QDO=quadruple drop out; AD=Aktivierungsdomäne von Gal4, BD=DNA-Bindedomäne von Gal4, N=N-Domäne, RRM1 bzw. RRM2=RNA-recognition motif 1 bzw. 2, C=C-Domäne). **(B)** Die Ko-Immunopräzipitation von Npl3-myc mit dem C-Terminus von Npl3 (C-npl3-GFP, links) zeigt eine RNase-insensitive Interaktion *in vivo*. Die Spezifität der Interaktion zeigen fehlende Signale für den N-Terminus von Npl3 (N-npl3-GFP, rechts) oder Hem15. Allen Reaktionen wurde 200 µg/ml RNaseA zugesetzt (L=Lysat, E=Eluat)

Um die Interaktionsdomäne noch weiter einzugrenzen, wurden schrittweise Verkürzungen von *NPL3* um 75 bp (= 25 Aminosäuren) vorgenommen und diese wiederum mit dem Volllängen-*NPL3*-Konstrukt in Yeast-Two-Hybrid-Analysen auf eine Interaktion überprüft (Abbildung 7A). Eine Deletion der C-terminalen 25 oder 50 Aminosäuren (AS) hatte keinen negativen Einfluss auf die Interaktion, wobei die Verkürzung um 75 AS ein deutliches Wachstumsdefizit hervorrief und die Verkürzung um 100 AS das Wachstum der Zellen auf dem Selektivmedium gänzlich ausblieb. Aus diesen Daten lässt sich eine minimale Npl3-Interaktionsdomäne von Aminosäure der Position 277 bis 364 festlegen (schematisch dargestellt in Abbildung 8D).



**Abbildung 7: Die minimale Interaktionsdomäne von Npl3-Molekülen ist für das Überleben der Zellen essentiell. (A)** Verkürzte *NPL3*-Konstrukte zeigen in Yeast-Two-Hybrid-Analysen, daß die Deletion von 25 bzw. 50 Aminosäuren ( $\Delta 25$  bzw.  $\Delta 50$ ) keinen Einfluss auf das Zell-Wachstum auf Vierfachselektionsplatten (QDO=quadruple drop out), dagegen aber eine weitere Verkürzung von Npl3 das Wachstum schwächt ( $\Delta 75$ ) oder ganz aufhebt ( $\Delta 100$  bzw.  $\Delta 125$ ). **(B)** Komplementationstest von *npl3Δ(+pNPL3 URA3)* mit *LEU2*-kodierenden Plasmiden der verkürzten Versionen von *NPL3*. Auf den Verlust des *URA3*-Plasmides wurde auf FOA (5-Fluoroorotic acid)-Platten selektiert. Alle Platten wurden wenn nicht anders angegeben bei 25°C für 3-4 Tage inkubiert.

Um eine Aussage über die Notwendigkeit der Npl3-Assoziation *in vivo* zu erhalten, wurden Komplementationsvektoren, die die verkürzten *NPL3*-Versionen und den Selektionsmarker *LEU2* tragen, hergestellt. Diese Vektoren beinhalten den 5'- und 3'-UTR von *NPL3* und wurden in *npl3Δ*-Zellen des S288c-Stammhintergrund eingebracht (Abbildung 7B). Da *NPL3* in diesem Stammhintergrund essentiell ist, lag der *npl3Δ*-Stamm bereits mit einem *URA3*-haltigen Vektor komplementiert vor. Über das Wachstum auf FOA(5-Fluoroorotic acid)-Platten wurde auf den Verlust des *URA3*-Plasmids selektiert.

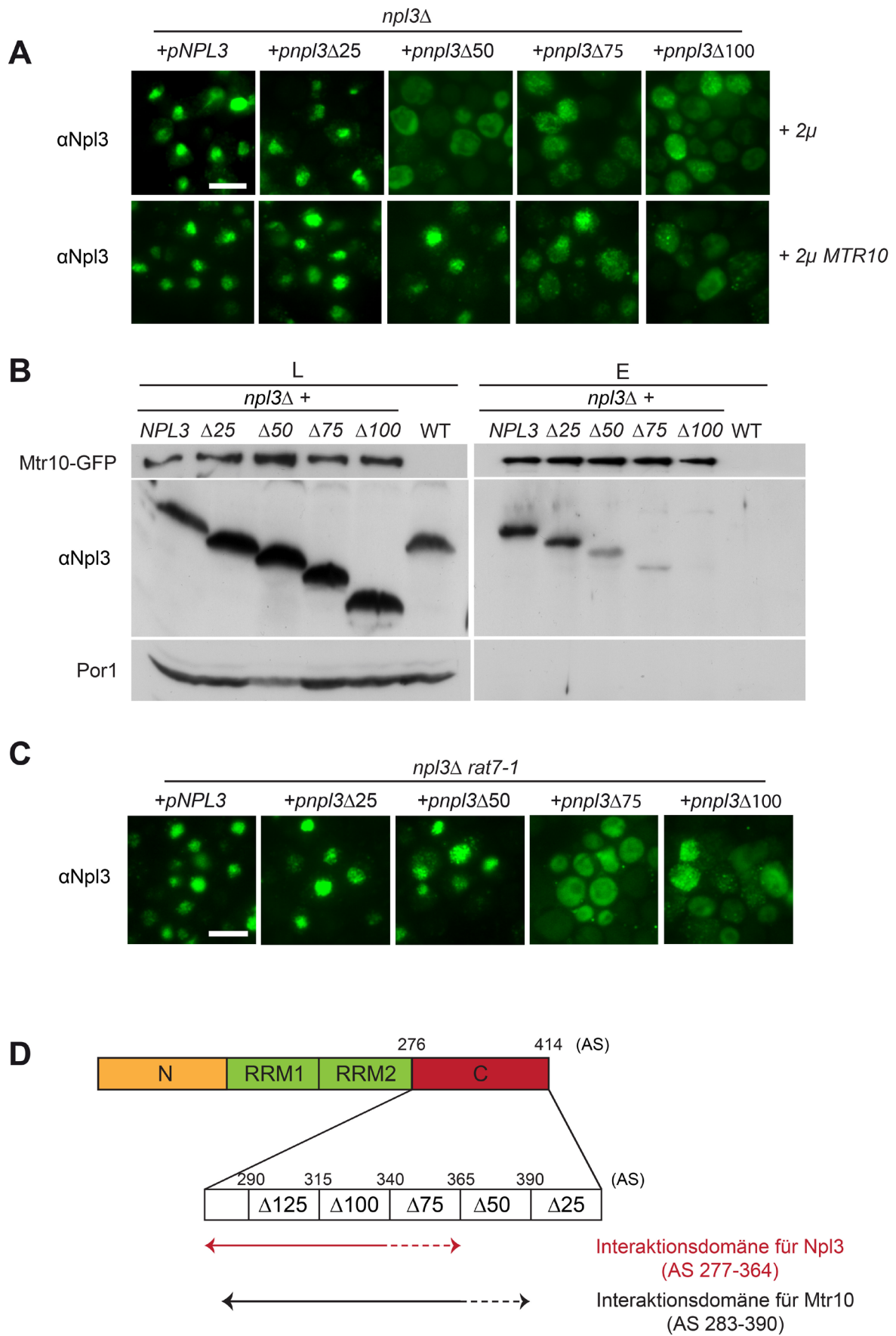
Wenn die Zellen mit dem *LEU2*-Vektor überlebensfähig waren, konnten sie auf FOA-Platten wachsen.

Interessanterweise korreliert die Stärke der Komplementation des *npl3Δ* mit den Interaktionsstärken aus den Yeast-Two-Hybrid-Analysen. Konstrukte, die um mehr als 50 AS verkürzt wurden, können *npl3Δ*-Zellen nur noch teilweise (*npl3Δ75* bzw. *npl3Δ100*) und eine weitere Verkürzung nicht mehr komplementieren (*npl3Δ125*). Dabei fällt besonders die Mutante *npl3Δ100* auf, die einen vollständigen Verlust der Interaktionsfähigkeit mit Npl3-Molekülen (Abbildung 7A) und trotzdem eine teilweise Komplementation der Knockout-Zellen aufweist. Diese Mutation wirkt sich schwerwiegender bei 37°C aus, bewirkt damit eine Temperatursensitivität der Zellen und führt zum Zelltod.

### **3.2 Die Interaktionsdomäne für Npl3-Moleküle überlappt mit der Bindedomäne für den Importrezeptor Mtr10**

Der C-Terminus von Npl3 (Aminosäurebereich 283-414) wurde bereits als Interaktionsdomäne für den Importrezeptor Mtr10 beschrieben (Senger et al., 1998). Aufgrund dessen wurde angenommen, dass die Bindung der verkürzten Npl3-Versionen zu Mtr10 beeinflusst sein kann. Eine Lokalisationsstudie sollte Aufschluss darüber geben. Mithilfe der Immunfluoreszenz mit einem Primärantikörper gegen Npl3 und einem Alexa488-gekoppelten Sekundärantikörper, konnte die zelluläre Verteilung ermittelt werden (Abbildung 8A). Dabei fällt auf, daß eine Misslokalisierung des Proteins im Zytoplasma bereits bei einer Verkürzung um 50 AS auftritt. Die Wiederherstellung der wildtypischen Kernlokalisierung kann aber durch Überexpression des Importers *MTR10* erreicht werden. Dagegen können die zytoplasmatischen Proteine *npl3Δ75* kaum und *npl3Δ100* nicht mehr im Kern angereichert werden (Abbildung 8A).

Die Lokalisationsstudie der Proteine wurde mit einer Interaktionsstudie untermauert. Über Ko-Immunopräzipitationen von Mtr10-GFP wurde versucht den jeweiligen Npl3-Bindepartner nachzuweisen (Abbildung 8B). Die Stärke der Interaktion zwischen der jeweiligen Npl3-Version und Mtr10 korreliert stark mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenz aus Abbildung 8A. Wobei *npl3Δ25* keine Unterschiede in der Bindung im Vergleich mit Wildtyp-Npl3 hat, schwächt sich diese mit *npl3Δ50* deutlich um die Hälfte ab, verringert sich weiterhin bei *npl3Δ75* und verschwindet gänzlich bei *npl3Δ100*.



**Abbildung 8: Die Interaktionsdomäne für Npl3-Proteine überlappt stark mit der Bindedomäne für den Importrezeptor Mtr10. (A)** Die zelluläre Lokalisation der Npl3-Proteine wurde mithilfe von Immunfluoreszenzanalysen ( $\alpha$ -Npl3 und  $\alpha$ -Hase-Alexa488) untersucht. Dabei wurden *npl3Δ*-Zellen mit verkürzten *NPL3*-Konstrukten komplementiert und die Protein-Lokalisation unter dem Einfluss eines 2 $\mu$ -Leervektors und eines 2 $\mu$ -Vektors mit *MTR10* untersucht. **(B)** Die Western-Blot-Analyse zeigt eine Ko-Präzipitation von Npl3-Versionen mithilfe von Mtr10-GFP. Die Detektion von Por1 diente als Negativinteraktion. **(C)** Die zelluläre Lokalisation der Npl3-Proteine in der mRNA-Exportmutante *rat7-1*. Zellen wurde mittels Immunfluoreszenz detektiert. Die Zellen wurden für 1 h bei 37°C inkubiert. **(D)** Schematische Darstellung von Npl3 mit Fokus auf die C-Domäne. Die Überlappung der Interaktionsdomäne für Npl3-Proteine ((AS) Aminosäurebereich 277-364) mit der Interaktions-domäne für Mtr10 (Aminosäurebereich 283-390) ist mithilfe von Pfeilen gekennzeichnet. (N= N-Domäne, RRM= RNA-recognition motif, C= C-Domäne). Der Maßstab in den mikroskopischen Aufnahmen entspricht 5  $\mu$ m.

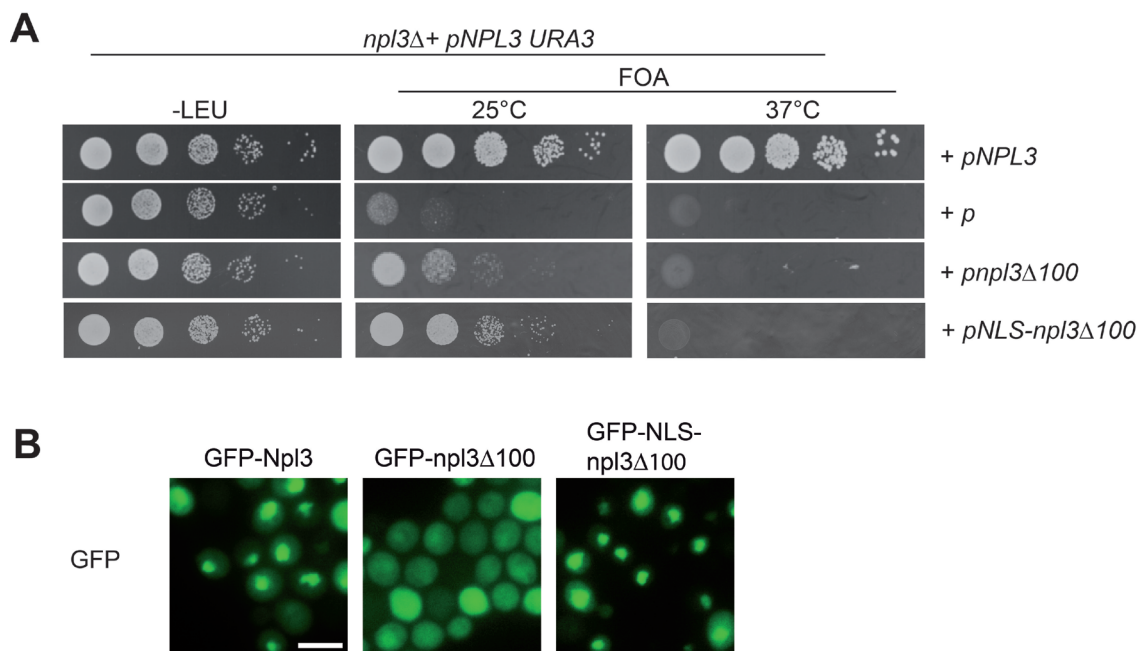
Ob der Transport der verkürzten Proteine vom Kern ins Zytoplasma an mRNPs gekoppelt ist, kann über den Transportblock von mRNA untersucht werden. Dazu wurden die dafür codierenden Vektoren in einen Stamm (*npl3Δ rat7-1*) eingebracht, der durch den *npl3Δ* und durch eine temperatursensitive Mutation der Kernporenkomponente Nup159 gekennzeichnet ist (Abbildung 8C). Die Mutation *rat7-1* führt zu starken Exportdefekten und zur Anreicherung von poly(A)<sup>+</sup>RNA im Zellkern (Gorsch et al., 1995). Für die Untersuchung der Proteinlokalisierung wurden erneut Immunfluoreszenz-Experimente nach der nicht-permissiven Temperatur von 37°C und 1h durchgeführt. Wie die Abbildung 8C erkennen lässt, konnte durch den blockierten mRNA-Export nur eine sichtbare Anreicherung von *npl3Δ50* im Kern beobachtet werden. Größere Verkürzungen von Npl3 sind nicht dominant im Kern sichtbar und scheinen nicht mehr mit dem mRNA-Transport verbunden zu sein.

Zusammenfassend belegen die Daten eine erhebliche Überschneidung der Interaktionsdomäne für Npl3-Moleküle und der Interaktionsdomäne für Mtr10 (Abbildung 8D). Demnach gehen Störungen in der Npl3-Npl3-Interaktion mit einer defekten Bindung von Mtr10 einher. Trotz der Verkürzung von Npl3 um 50 Aminosäurereste (*npl3Δ50*) kann das Protein noch an Transportprozessen. Eine weitere Verkürzung führt jedoch zu einer starken Misslokalisierung und die Teilnahme an Exportprozessen aus dem Zellkern ist eher unwahrscheinlich.



### 3.2.1 Die Relokalisation von *npl3Δ100* in den Zellkern hat marginale Wachstumsvorteile

Aufgrund der vorherigen Daten (Abbildung 8) liegt die Vermutung nahe, daß die Wachstumsdefekte einer Mutante mit Störungen in der Npl3-Interaktion eventuell ihre Ursachen in der Misslokalisierung des Proteins haben (Abbildung 8A).



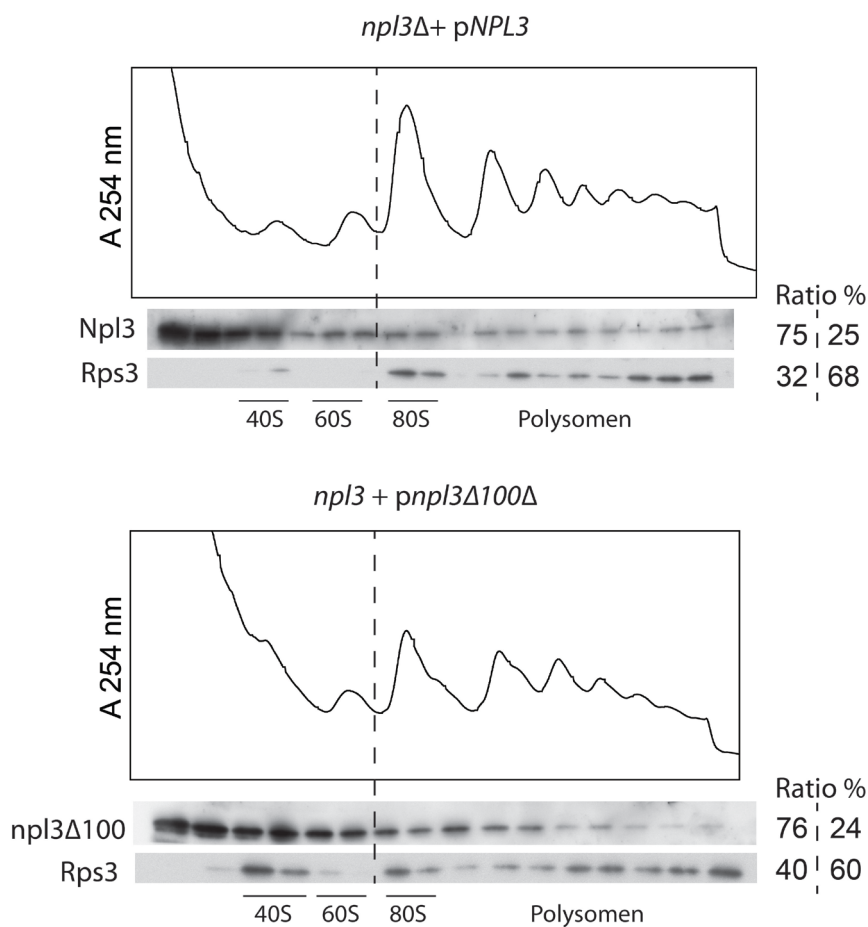
**Abbildung 9: Der Kernimport von *npl3Δ100* hat einen mäßigen Einfluss auf die Komplementation von *npl3Δ*.** (A) Der Wachstumstest auf FOA (5-Fluoroorotic acid)-Platten, die auf den Verlust des *URA3*-haltigen Plasmids selektieren, demonstriert einen geringfügigen Wachstumsvorteil für *NLS-npl3Δ100*-tragende Zellen und die Letalität bleibt bei 37°C bestehen. Die Platten wurden für 3-4 Tage inkubiert. (B) GFP-Lokalisationsstudien belegen den erfolgreichen Reimport von *npl3Δ100* durch die Fusion eines NLS (*nuclear localisation signal*) von SV40. Der Maßstab entspricht 5 µm.

Um dies exemplarisch zu testen, wurde ein Mtr10-unabhängiges Kerntransportsignal an das Protein *npl3Δ100* fusioniert. Das *nuclear localisation signal*, kurz NLS, stammt aus dem Simian Virus 40 (SV40) und bedient sich dem Transportweg über Importin  $\alpha/\beta$ . Die Relokalisation von *NLS-npl3Δ100* in den Zellkern wurde über eine Immunfluoreszenz (Diplomarbeit Frederik Hinz) sowie über GFP-Mikroskopie bestätigt (Abbildung 9B). Im Vergleich zu *npl3Δ100*- haben *NLS-npl3Δ100*-Zellen zwar einen Wachstumsvorteil bei 25°C, aber der ist nur geringfügig. Außerdem bleibt die Temperatursensitivität der Zellen bei 37°C bestehen, was zur Letalität im gleichen Maße wie bei *npl3Δ100*-Zellen führt.



### 3.2.2 *npl3Δ100* ist nicht verstärkt mit Polysomen assoziiert

Wie die Abbildung 8 demonstrierte, ist der Importrezeptor Mtr10 nicht mehr in der Lage *npl3Δ100* zu binden. Eine gestörte Bindung zu Mtr10 kann zu einer verlängerten Assoziation von Npl3 mit Polysomen führen. Die Autoren Windgassen et al. postulieren, daß Npl3 durch die Interaktion mit Mtr10 von der mRNA abgelöst wird. Wenn diese Interaktion jedoch vermindert ist, kommt es zu einer Anreicherung von Npl3 an Ribosomen-tragenden mRNAs (Windgassen et al., 2004).



**Abbildung 10: Mtr10-interaktionsdefektes *npl3Δ100* ist nicht verstärkt Polysomen-assoziiert.** Die Verteilung der Proteine Npl3 (oben) bzw. *npl3Δ100* (unten) wurde im Saccharosedichtegradienten mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Rps3 gilt als Ladungskontrolle der 40S-haltigen Fraktionen. Die detektierten Signale eines Proteins wurden quantifiziert und als Anteil am Gesamtsignal in Prozent angegeben (Ratio). Die gestrichelte Linie trennt Fraktionen ohne Monosomen (80S) von Fraktionen mit Monosomen.

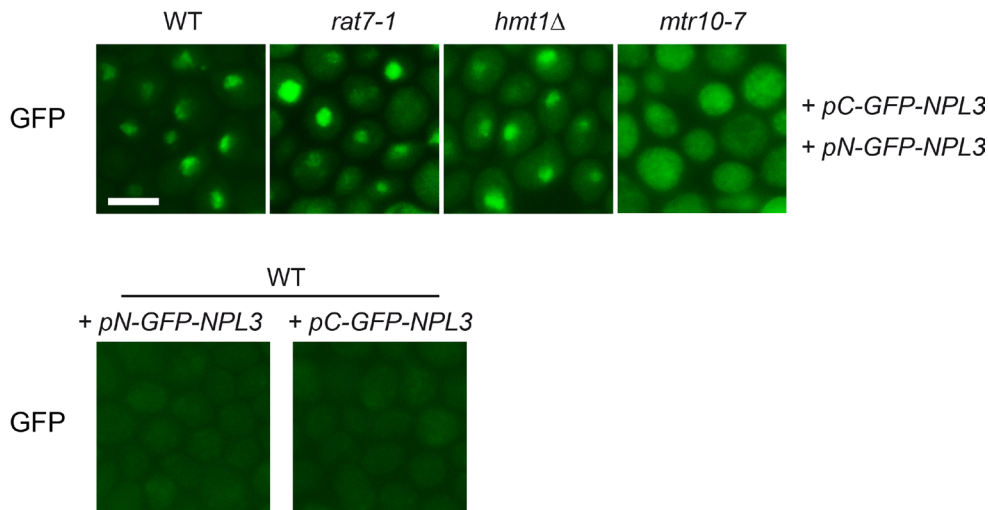
Ein ähnliches Phänomen würde bei *npl3Δ100* in Betracht kommen und daher wurde dessen Verteilung im Saccharosedichtegradienten untersucht (Abbildung 10).

Über eine Western-Blot-Analyse wurden kopräzipitierte Proteine aus Gradientenfraktionen mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht. Die erhaltenen Signale wurden mit dem Programm Bio-1D quantifiziert, wobei der Gradient in Monosomen-haltige Fraktionen und Fraktionen ohne Monosomen eingeteilt wurde. Die Werte wurden auf die Gesamtsignalmenge bezogen und in Prozent angegeben. Dabei konnte eine polysomale Verteilung beider Npl3-Proteine von ca. 25% ermittelt werden, währenddessen Rps3 zu durchschnittlich 65% mit Polysomen kopräzipitiert. Demnach konnte keine stärkere Assoziation von npl3 $\Delta$ 100 im Vergleich zum Wildtyp-Protein mit translatierten mRNAs beobachtet werden. Eine Erklärung dafür wäre eine geringere Affinität oder Bindung von npl3 $\Delta$ 100 an mRNA. Da Npl3 auch mit 60S-Partikeln assoziiert, könnten über diese auch Npl3-Moleküle in Polysomenfraktionen einfließen. Eine gestörte Bindung an 60S-Ribosomen könnte damit einen ähnlichen Effekt auslösen. Diese Möglichkeiten werden in den folgenden Abschnitten genauer untersucht (3.4.1 bzw. 3.7).

### 3.3 Interagierende Npl3-Moleküle lokalisieren im Kern und im Zytoplasma

Um die Frage zu klären, in welchen Kompartimenten der Zelle Npl3-Moleküle miteinander interagieren, wurde die Methode der Fluoreszenz-Komplementation genutzt (Kerppola, 2006). Als fluoreszierendes Proteintag wurde eGFP genutzt. Dazu wurde das 239 Aminosäuren-lange eGFP in einen N-terminalen (1-155 AS) und einen C-terminalen Bereich (156-239 AS) geteilt und jeweils mit Npl3 fusioniert. Beide plasmidkodierte Konstrukte (*N-GFP-NPL3* bzw. *C-GFP-NPL3*) wurden zusammen oder einzeln in Wildtypzellen eingebracht und auf Fluoreszenzsignale überprüft. Während die Konstrukte einzeln keine Fluoreszenz auslösten, war in Wildtypzellen mit beiden Vektoren ein deutliches Kernsignal zu erkennen (Abbildung 11). Auch in der mRNA-Exportmutante *rat7-1* konnte ein Kernsignal ausgemacht werden. Angesichts der mehrfachen Methylierung von Npl3 in der C-terminalen Domäne sollte die Bedeutung des Methylierungsstatus auf die Npl3-Npl3-Interaktion analysiert werden. Dazu wurde ein Stamm mit der Deletion von *HMT1*, kodierend für eine Arginin-Methyltransferase, genutzt. Die GFP-Signale in *hmt1 $\Delta$* -Zellen waren jedoch im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Dagegen weist die Mutante *mtr10-7*, mit Defekten im Npl3-Zellkernimport, eine Interaktion von Npl3-Proteinen im Zytoplasma auf. In Folge des verringerten

Transports von Npl3 in den Zellkern, reichert sich das GFP-Signal zytoplasmatisch an. Es kann also demonstriert werden, daß Npl3-Moleküle im Kern und im Zytoplasma interagierend vorliegen können.



**Abbildung 11: Die Interaktion zwischen Npl3-Molekülen findet im Kern und Zytoplasma statt.** Gezeigt ist das GFP-Signal interagierender Npl3-Moleküle durch die Fluoreszenzkomplementation. Der N-Terminus und der C-Terminus von GFP, fusioniert an Npl3 (C-GFP-Npl3 bzw. N-GFP-Npl3), müssen in unmittelbare Nähe kommen um ein fluoreszierendes GFP zu bilden. Das Signal wurde nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C in Wildtypzellen, der mRNA-Exportmutante *rat7-1*, der Methyltransferasemutante *hmt1Δ* und der Importrezeptormutante *mtr10-7* verglichen. Darunter ist der Wildtyp mit Einzelvektoren dokumentiert. Der Maßstab entspricht 5 µm.

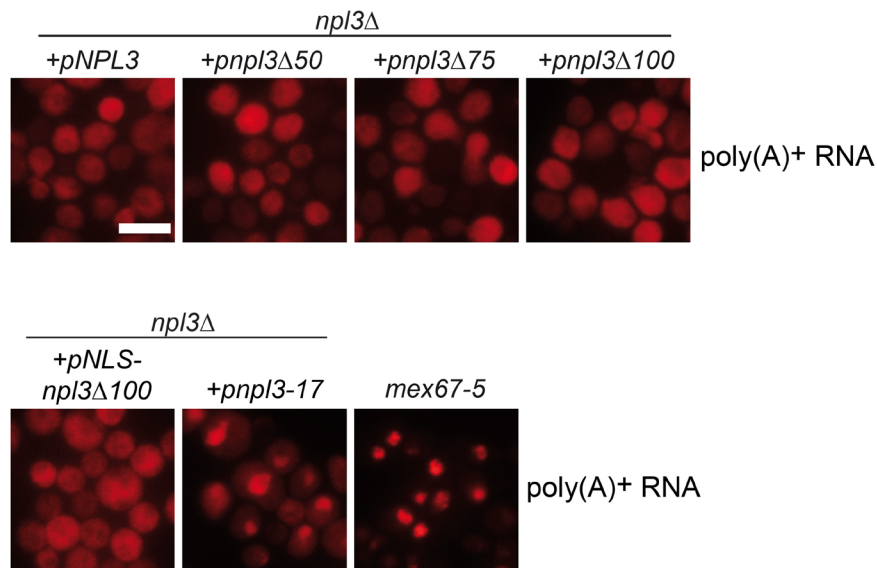
Ob Mtr10 eine Bedeutung bei dem Transport interagierender Npl3-Proteine oder bei der Dissoziation von Npl3-Npl3-Verbindungen hat, kann mit diesem Experiment nicht direkt geklärt werden. Da Npl3 ein bekannter mRNA- und 60S-Exportfaktor ist (Hackmann et al., 2011; Lee et al., 1996) und diese Funktionen den Zellkern bedingen, stellt sich nun die Frage in welchem Kompartiment die Interaktion von Npl3-Molekülen einen Nutzen hat.

### 3.4 Eine gestörte Npl3-Npl3-Interaktion korreliert mit Translationsdefekten

#### 3.4.1 NPL3-Interaktionsmutanten besitzen einen funktionsfähigen Transport von poly(A)<sup>+</sup>RNA

Die vorherigen Daten demonstrierten für nicht-Interaktionsfähige Npl3-Mutanten einen starken Wachstumsdefekt (Abbildung 7) und Npl3-Npl3-Interaktionen sind im Zellkern

und im Zytoplasma zu finden (Abbildung 11). Um die Gründe der Wachstumsdefekte aufzudecken und die Bedeutung der Npl3-Interaktion zu analysieren, wurde zunächst die nukleäre mRNA-Exportfunktion in den Mutanten untersucht. Hierbei wurde poly(A)<sup>+</sup>RNA mithilfe einer Cy3-markierten oligo dT-Sonde in den Zellen sichtbar gemacht.



**Abbildung 12: Der Transport von poly(A)<sup>+</sup>RNA in interaktionsdefekten Mutanten von *NPL3* ist ungestört.** Das Ergebnis einer FISH mit einer Cy3-gekoppelten oligo-dT-Sonde zeigt die Lokalisation der mRNA in Zellen nach einer Temperaturänderung für 1 h bei 37°C. Die bekannten mRNA-Exportmutanten *npl3-17* und *mex67-5* zeigen eine starke Kernakkumulation, wobei die Interaktionsmutanten von *NPL3* (vor allem *npl3Δ75* und *npl3Δ100*) eine zytoplasmatische Verteilung der mRNA aufweisen. Der Maßstab entspricht 5 µm.

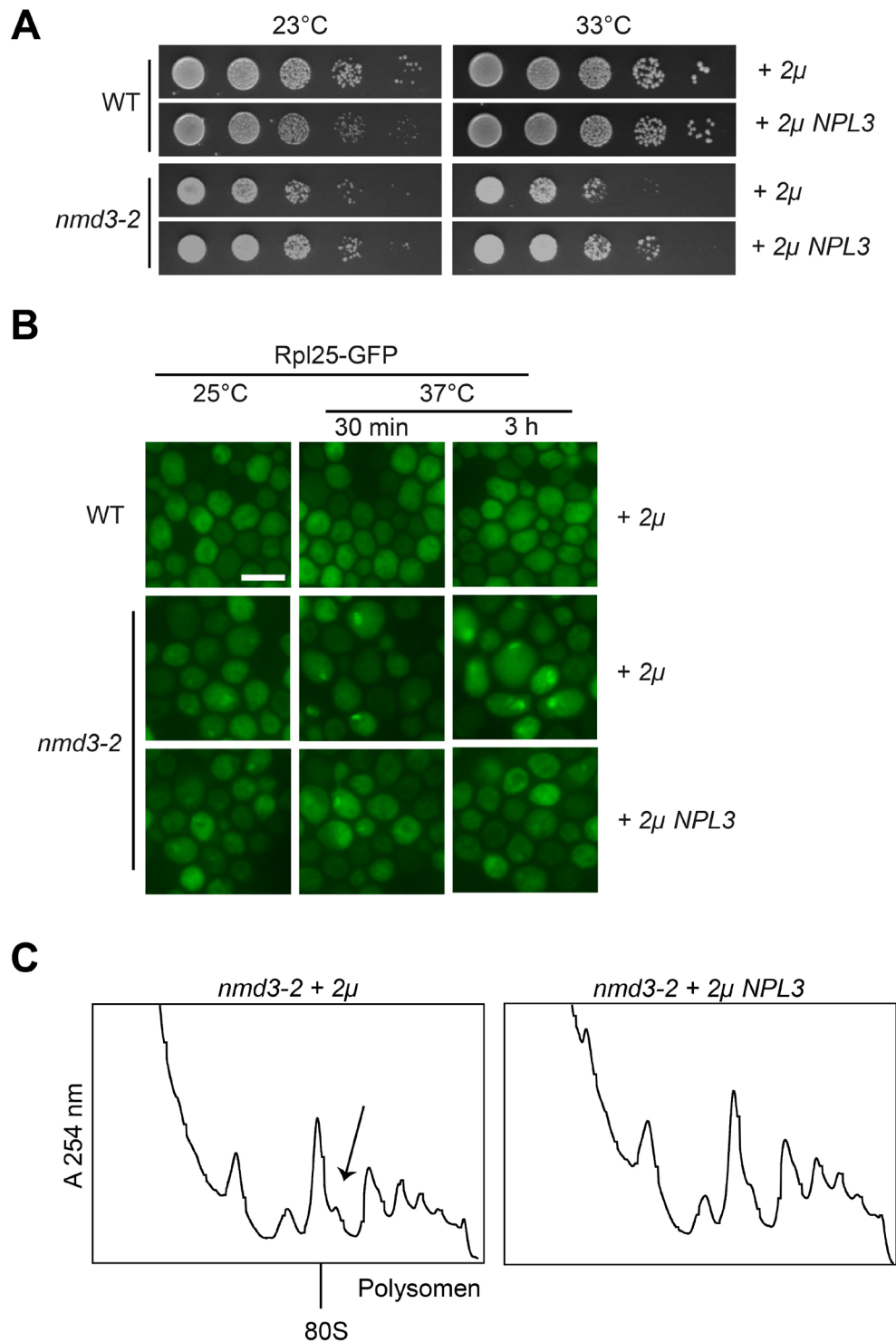
Für eine positive Anfärbung von poly(A)<sup>+</sup>RNA im Zellkern wurden die Exportmutanten *npl3-17* und *mex67-5* mitgeführt (Abbildung 12A). Allerdings konnte keine Anreicherung des Signals im Kern in den verkürzten Mutanten von *NPL3* belegt werden. Die Verteilung der mRNA ist verglichen zum Wildtyp unverändert zytoplasmatisch. Auch die NLS-Version von *npl3Δ100* besitzt keine Defekte im mRNA-Export, obwohl das Protein in den Zellkern gelangt (Abbildung 9). Trotz einer nukleären Depletion von *npl3Δ100* ist der mRNA-Transport nicht beeinträchtigt, demnach wäre Npl3 unter diesen Bedingungen für den mRNA-Export nicht essentiell, wie bereits in einer anderen Arbeit gezeigt werden konnte (Hackmann et al., 2011).

### 3.4.2 *NPL3*-Interaktionsmutanten verfügen über einen ungestörten Prä-60S-Transport

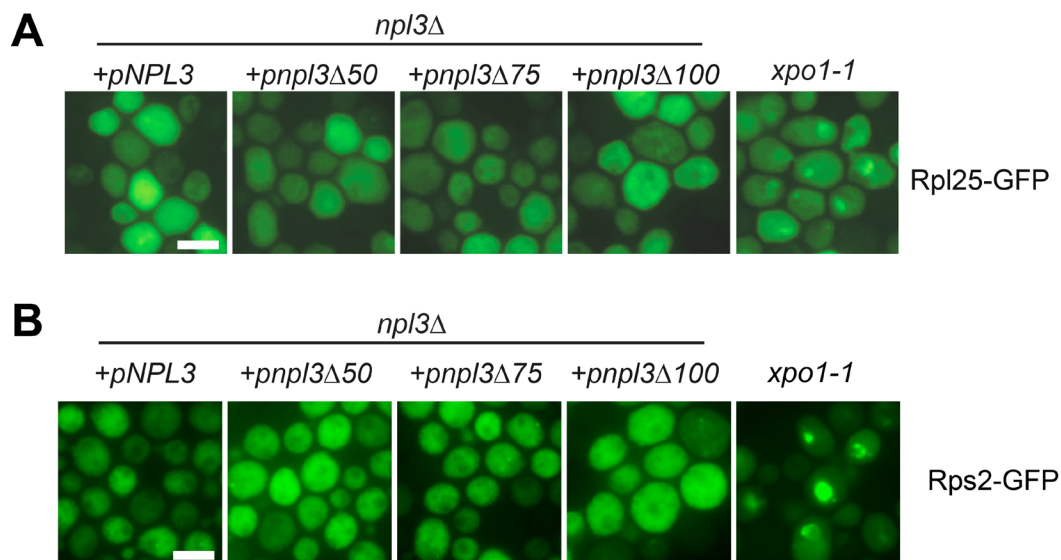
Npl3 wurde vor kurzem eine Funktion im Prä-60S-Export zugeschrieben (Hackmann et al., 2011). Die Ergebnisse der Autoren stützen das Modell, daß Npl3 über die Bindung der 25SrRNA und der Herstellung des Kontakts zur Kernpore über Nup60, Prä-60S-Partikel transportiert. In der vorliegenden Arbeit wurde dafür untersucht, ob Npl3 Prä-60S-Export-Defekte in einer anderen Exportmutante (*nmd3-2*) ausgleichen kann (Abbildung 13) und konnte damit Daten zur dieser Veröffentlichung beitragen. Über die Überexpression von *NPL3* kann das Wachstum (Abbildung 13A), die Misslokalisierung der Prä-60S-Partikel (Abbildung 13B) sowie die Schulterbildung, durch den Mangel an 60S-Ribosomen im Zytoplasma (Abbildung 13C), in *nmd3-2*-Zellen kompensiert oder gemindert werden.

Durch diese zweite Transportfunktion von Npl3, liegt es nahe auch diesen Prozess in Zellen mit verkürzten Npl3-Versionen zu untersuchen. Mittels Lokalisationsstudien des GFP-markierten, ribosomalen Proteins Rpl25 der 60S-Untereinheit wurden dennoch keine Defekte, über eine mögliche Misslokalisierung dokumentiert (Abbildung 14A). Wildtypzellen wie auch *NPL3*-Interaktionsmutanten wiesen keine Anreicherung des GFP-Signals im Kern auf, im Gegensatz zur Prä-60S- und Prä-40S-Export-Mutante *xpo1-1*.

Um zusätzlich Störungen im Transport der kleinen ribosomalen Untereinheit auszuschließen, wurde das GFP-getagte Protein Rps2 auf die zelluläre Verteilung untersucht. Als Komponente des 40S-Partikels kann Rps2-GFP bei Exportdefekten nukleär lokalisieren, wie in der Mutante *xpo1-1* gezeigt (Abbildung 14B). Auch in dieser Analyse war keine Anreicherung des GFP-Signals in den verkürzten *NPL3*-Mutanten zu erkennen.



**Abbildung 13: Npl3 ist ein Prä-60S-Exportrezeptor und kann Transportdefekte in einer Mutante kompensieren.** (A) Die bekannte Prä-60S-Exportmutante *nmd3-2* erhält durch Überexpression von *NPL3* eine höhere Wachstumsrate, (B) eine Unterstützung im Prä-60S-Export vom Zellkern ins Zytoplasma bei der nicht-permissiven Temperatur von 37°C, visualisiert über das GFP-getaggte ribosomale Protein Rpl25-GFP und (C) eine sichtbare Verminderung der Schulterbildung (siehe Pfeil) im Polysomenprofil bei der semi-permissiven Temperatur von 30°C. (Daten veröffentlicht in Hackmann et al., 2011). Der Maßstab der mikroskopischen Aufnahmen entspricht 5 μm.



**Abbildung 14: Der ribosomale Export ist unbeeinflusst in Mutanten mit gestörter Npl3-Interaktion.** Der Prä-60S- bzw. Prä-40S-Transport wurde mittels GFP-Mikroskopie der ribosomalen Protein Rpl25-GFP **(A)** bzw. Rps2-GFP **(B)** untersucht. Gezeigt sind *np/3Δ*-Zellen komplementiert mit *NPL3*-Konstrukten sowie die Prä-40S- und Prä-60S-Exportmutante *xpo1-1*. Der Maßstab entspricht 5 µm.

### 3.4.3 *NPL3*-Interaktionsmutanten sind durch Translationsdefekte gekennzeichnet

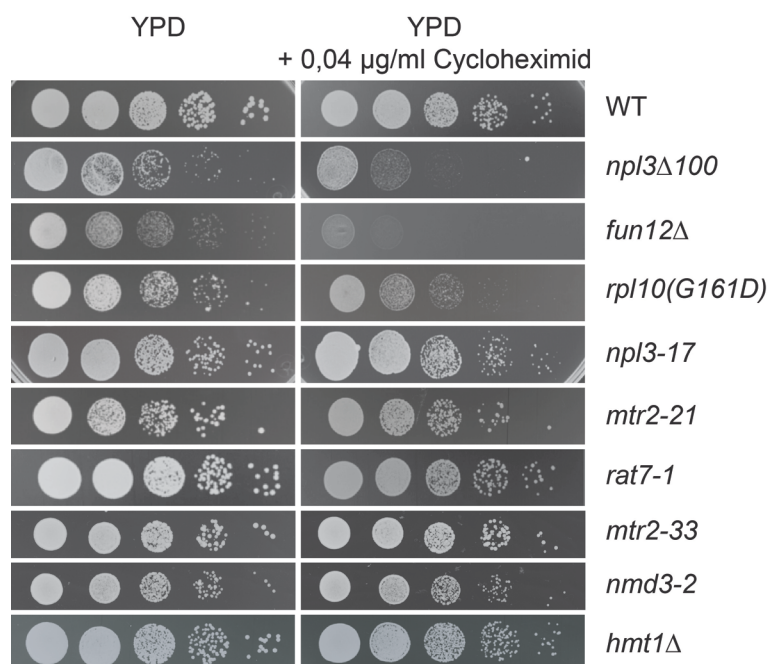
Weil die Transportprozesse in *np/3Δ100*-Zellen keine auffälligen Defekte aufzeigen, wurde die Möglichkeit einer unbekannten zytoplasmatischen Funktion von Npl3 in Betracht gezogen. Es wurde gezeigt, daß Npl3 auch nach dem nukleo-zytoplasmatischen Transport mit Polysomen assoziiert ist (Abbildung 10 und Windgassen et al., 2004). Daraufhin wurde die *NPL3*-Mutante *np/3Δ100*, mit dem vollständigen Verlust der Npl3-Npl3-Interaktion, gewählt und auf die Sensitivität eines Translationsinhibitors getestet. Abbildung 15 demonstriert eine vergleichende Wachstumsanalyse von Stämmen auf Vollmedium (YPD) und Vollmedium mit dem Translationselongationshemmer Cycloheximid. Es wurden verschiedene Konzentrationen von Cycloheximid getestet, wobei sich die Ergebnisse stark ähnelten und sich für die Abbildung mit 0,04 µg/ml entschieden wurde. Wildtypzellen zeigen kaum eine Wirkung auf diese Substanz, während *np/3Δ*-Zellen eine starke Sensitivität aufweisen, ähnlich wie die Mutanten *fun12Δ* und *rpl10(G161D)*, die Störungen der Translationsintiation inne haben (Abbildung 15).

Die Mutante *np/3-17* ist durch einen geschädigten mRNA- und 60S-Export gekennzeichnet (Hackmann et al., 2011). Erstaunlich ist, daß trotz der kombinierten Defekte beider



Transportprozesse kein Wachstumsnachteil durch die zusätzliche Drogeneinwirkung für *npl3-17*-Zellen entsteht.

Um einen generellen Überblick über die additive Wirkung von Cycloheximid mit Störungen im mRNA- oder 60S-Export zu erreichen, wurden weitere Mutanten getestet. Die starke Nukleoporinmutante *rat7-1*, sowie *mtr2-33*, beides mRNA-Exportmutanten, zeigten genauso wenig einen Wachstumsdefekt wie die 60S-Export-Mutanten *mtr2-33* oder *nmd3-2*.



**Abbildung 15: Die Sensitivität der Interaktionsmutante *npl3Δ100* auf den Translationsinhibitor Cycloheximid ist vergleichbar mit der Sensitivität von Mutanten der Faktoren der späten Translationsinitiation.** Eine Wachstumsanalyse auf Vollmediumplatten (YPD) versetzt mit 0,04 µg/ml Cycloheximid lässt einen starken Wachstumsdefekt für *npl3Δ100*-Zellen, den Stamm mit der Deletion von *eIF5B/FUN12* und für die Mutante des ribosomalen Proteinfaktors *RPL10* erkennen, wobei mRNA-Export-Mutanten (*npl3-17*, *rat7-1*, *mtr2-21*) oder 60S-Exportmutanten (*nmd3-2*, *mtr2-33*), sowie Zellen mit der Deletion der Methyltransferase (*hmt1Δ*) keinen Wachstumseinfluss erkennen lassen. (Die Daten stammen aus dieser Arbeit und der Doktorarbeit von Alexandra Hackmann, AG Krebber)

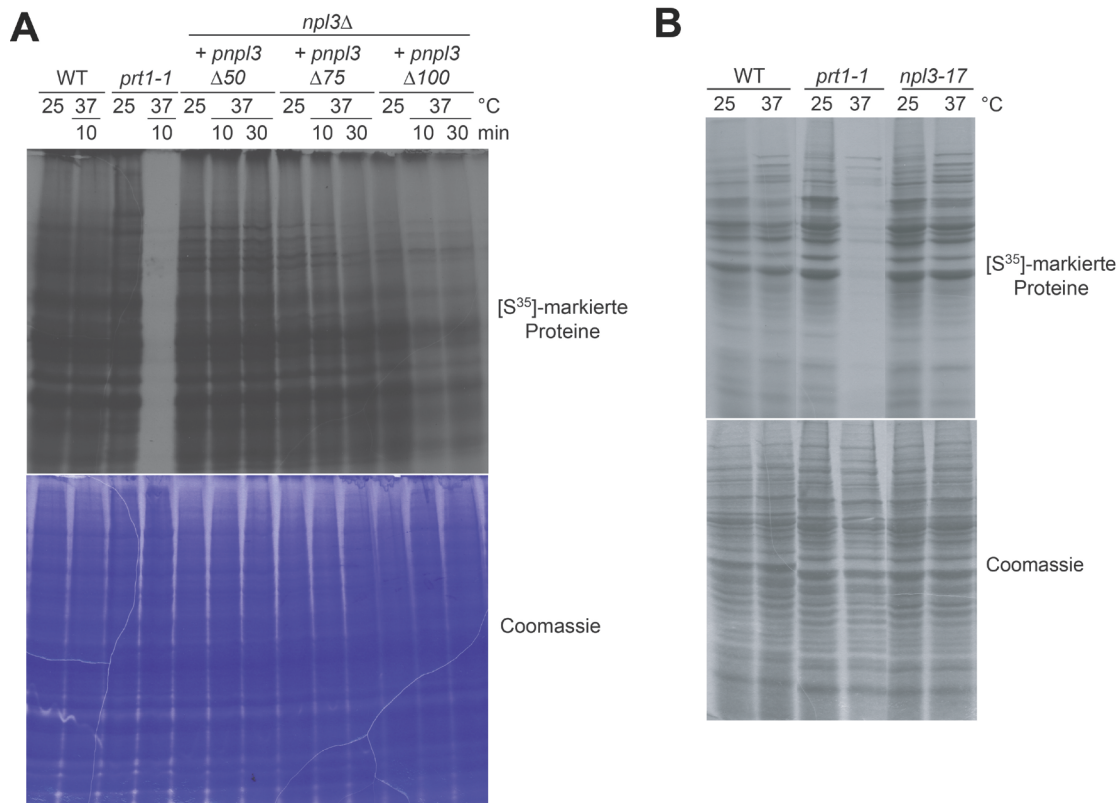
Um einen Hinweis auf die Wirkung des Methylierungsmangels von Npl3 auf eine Cycloheximid-Sensitivität zu erhalten, wurde zusätzlich der Stamm *hmt1Δ* in der Analyse geprüft. Die Deletion des Gens für die Arginin-Methyltransferase Hmt1 führt zum vollständigen Verlust der Methylierung von Npl3 (McBride et al., 2005). Da *hmt1Δ*-Zellen keine Wirkung auf die Substanz zeigt, kann davon ausgegangen werden, daß die Sensitivität von *npl3Δ100*-Zellen nicht auf fehlende Methylierungen zurückzuführen ist.



In Zusammenhang mit fehlenden mRNA- und 60S-Exportdefekten in *npl3Δ100*-Zellen, belegt die Abbildung 15 vielmehr, daß die sensitive Wirkung von Cycloheximid in einer Störung einer weiteren Funktion von Npl3 begründet ist.

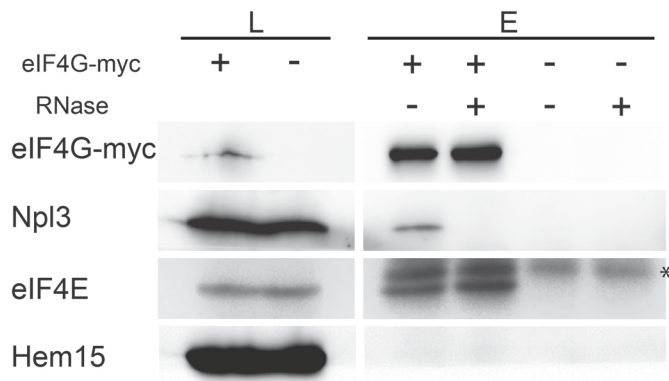
Diese Ergebnisse führten zur Überlegung den Prozess der Translation genauer zu untersuchen. Mithilfe der *in vivo*-Markierung von Proteinen über den Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin kann die Protein-Neusynthese in einer bestimmten Zeit analysiert werden. Das Ergebnis dieser Analyse ist exemplarisch in Abbildung 16 dargestellt. Ein Röntgenfilm demonstriert die Signale von [<sup>35</sup>S]-markierten Proteinen, die innerhalb von 10 min synthetisiert wurden. Dabei wurde die Laufspur als Gesamtsignal eines Stammes betrachtet. Eine Proteinbestimmung der Zellextrakte war notwendig um die Beladung des SDS-Gels mit jeweils 100 µg Gesamtprotein zu garantieren. Als Assay-Kontrolle für sehr starke Defekte in der Translationsinitiation wurde die temperatursensitive eIF3-Mutante *pvt1-1* mitgeführt. Sie weist kaum eine Synthese von Proteinen nach einer Präinkubation bei 37°C auf. Die Proteinsynthese der *NPL3*-Mutanten *npl3Δ75* und *npl3Δ100* ist, je nach Stärke des Npl3-Npl3-Interaktionsverlusts auch stark reduziert. So zeigen *npl3Δ100*-Zellen, die keine Npl3-Interaktion besitzen, eine größere [<sup>35</sup>S]-Signalabnahme, als *npl3Δ75*-Zellen (Abbildung 16A). Im Gegensatz zu *npl3Δ50*-Zellen, die keine Reduktion im Vergleich zum Wildtyp Interessanterweise konnte, korrelierend mit der Insensitivität gegenüber dem Translationshemmer Cycloheximid ( Abbildung 15), kein Defekt in der Proteinsynthese von *npl3-17*-Zellen erkannt werden (Abbildung 16B). Eine Beeinträchtigung des mRNA-Exports und des 60S-Exports ist also noch keine Voraussetzung um Translationsdefekte hervorzurufen.

Demnach verdeutlichen die Ergebnisse, daß speziell *NPL3*-Mutanten mit fehlender Npl3-Npl3-Interaktion durch eine globale Störung der Translation charakterisiert sind.



**Abbildung 16: Die Translation in Interaktionsmutanten von *NPL3* ist stark verringert.** Die Proteinneusynthese ist mithilfe eines Röntgenfilms (oben) dargestellt. Zu sehen sind die Signale von [<sup>35</sup>S]-markierten Proteinen über den Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin innerhalb von 10 min. Die Stämme wurden bei 25°C oder 37°C präinkubiert. Zur Kontrolle des Gesamtproteingehalts der Zellysate wurde entsprechend das SDS-Gel mit Coomassie gefärbt (unten). **(A)** Dargestellt ist Proteinneusynthese von *NPL3*-Mutanten, Wildtypzellen und der Translationsinitiationsmutante *prt1-1* bei 25°C und nach 10-minütiger oder 30-minütiger Prä-Inkubation bei 37°C. **(B)** Proteinneusynthesen der mRNA- und 60S-Exportmutante *npl3-17*, Wildtypzellen und der Mutante *prt1-1* bei 25°C und nach einer 30-minütigen Prä-Inkubation bei 37°C. (Die Daten stammen aus der vorliegenden Arbeit und aus der Doktorarbeit von Thomas Groß, AG Krebber)

Kürzlich wurde veröffentlicht, daß SR-Domänen im Allgemeinen einen Translations-hemmenden Einfluss über die Interaktion mit eIF4G bewirken können (Rajyaguru et al., 2012). Die Autoren wiesen eine direkte Interaktion zwischen dem heterolog exprimierten SR-Protein Npl3 und eIF4G nach, und zeigten eine hemmende Wirkung auf die Proteinsynthese eines Reportergens über ansteigende Konzentrationen von Npl3 *in vitro*. Wenn die SR-Domäne allerdings fehlte, konnte keine Hemmung der Translation beobachtet werden.



**Abbildung 17:** Die physikalische Interaktion zwischen eIF4G, einer Untereinheit des mRNA-Kappen-Bindekomplexes, und Npl3 ist indirekt und wird *in vivo* über RNA vermittelt. Die Western-Blot-Analyse der Ko-Immunopräzipitation von eIF4G-myc deckt eine RNase-sensitive Interaktion zu Npl3 auf, während die Interaktion von eIF4G zu eIF4E durch RNase-Zugabe ungestört bleibt. Die Detektion von Hem15 dient der Kontrolle von unspezifischen Bindungen. (L=Lysat, E=Eluat, \*= unspezifisches Signal))

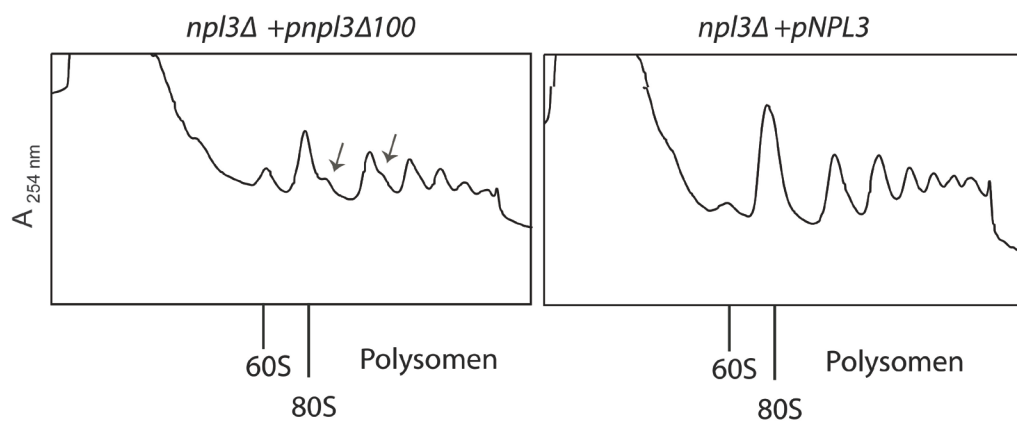
Um diesem Hinweis nachzugehen, wurde in dieser Arbeit die Interaktion von Npl3 und eIF4G *in vivo* untersucht. Dazu wurde eine Ko-Immunopräzipitation von genomisch getagtem eIF4G-myc in Hefe durchgeführt (Abbildung 17). Auffallend hierbei ist die RNase-sensitive Interaktion zwischen Npl3 und dem Kappen-bindenden Protein eIF4G. Diese Protein-Verbindung scheint durch einzelsträngige RNA vermittelt zu sein. Im Gegensatz dazu bleibt die Interaktion zwischen den Kappen-assoziierten Proteinen eIF4G und eIF4E auch unter RNase-Zugabe unvermindert.

Mit dem Wissen, daß *npl3Δ100*-Zellen denen die Npl3-SR-Domäne fehlt und trotzdem Translationsdefekte aufweisen und dem Ergebnis, daß Npl3 scheinbar *in vivo* keinen direkten Proteinkontakt mit eIF4G hat, kann die inhibierende Wirkung von wildtypischem Npl3 auf die globale Translation hinterfragt werden. Vielmehr machen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf die Bedeutung der SR-Domäne von Npl3 auf eine unterstützende Funktion in der Translation aufmerksam.

### 3.5 Ein Defekt in der Npl3-Npl3-Interaktion geht mit einer gestörten Monosomenbildung an mRNA einher

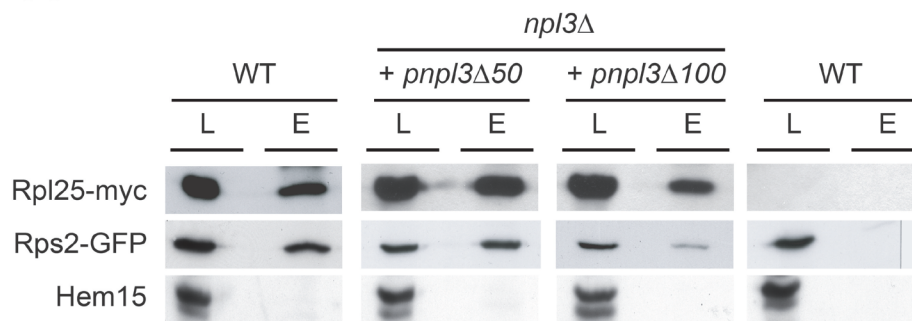
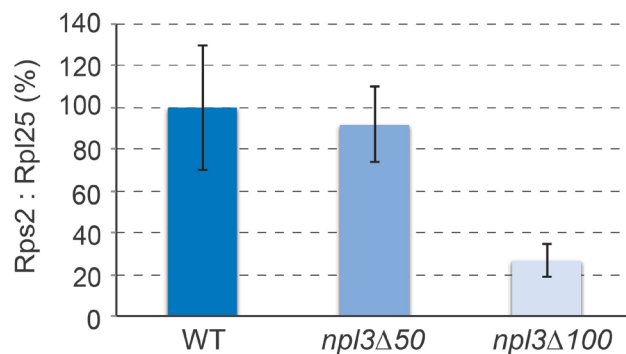
#### 3.5.1 Das Polysomenprofil von *np13Δ100*-Zellen ist durch verlangsamte Translationsinitiationsereignisse gekennzeichnet

Wenn Zellen Translationsdefekte aufweisen, ist es interessant zu untersuchen, ob man charakteristische Eigenschaften in einem Polysomenprofil erkennen kann. Deshalb wurde das Polysomenprofil von *np13Δ100*-Zellen mithilfe von Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation und anschließender Absorption bei 254 nm analysiert.



**Abbildung 18:** Das Polysomenprofil von *np13Δ100*-Zellen ist durch einen Schulter-Phänotyp charakterisiert und deutet auf verlangsamte Translationsinitiationsereignisse hin. Die graphische Darstellung demonstriert die Absorption (254 nm) von Zelllysaten der *np13Δ*-Zellen, komplementiert durch Vektoren mit *np13Δ100* oder *NPL3*, nach einer Saccharose-Dichtengradientenzentrifugation. Die Pfeile kennzeichnen zusätzliche Schultern an den dominierenden Peaks.

Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist, zeigt das Profil von *np13Δ100*-Zellen im Vergleich zum Wildtyp abfallende Peakhöhen in den hinteren Polysomenfraktionen, was auf eine weitgehend schlechte Translationsrate hinweist, und eine Schulterbildung am 80S- bzw. ersten Polysomen-Peak. Diese Schultern entstehen durch die Akkumulation von mRNAs, die ein oder mehrere Monosomen und eine zusätzliche, am Startcodon sitzende 40S-Untereinheit tragen (Helser et al., 1981). Dieses Phänomen wird sichtbar, wenn in der Zelle die Zusammenführung beider ribosomaler Untereinheiten um einige Zeit verzögert ist.

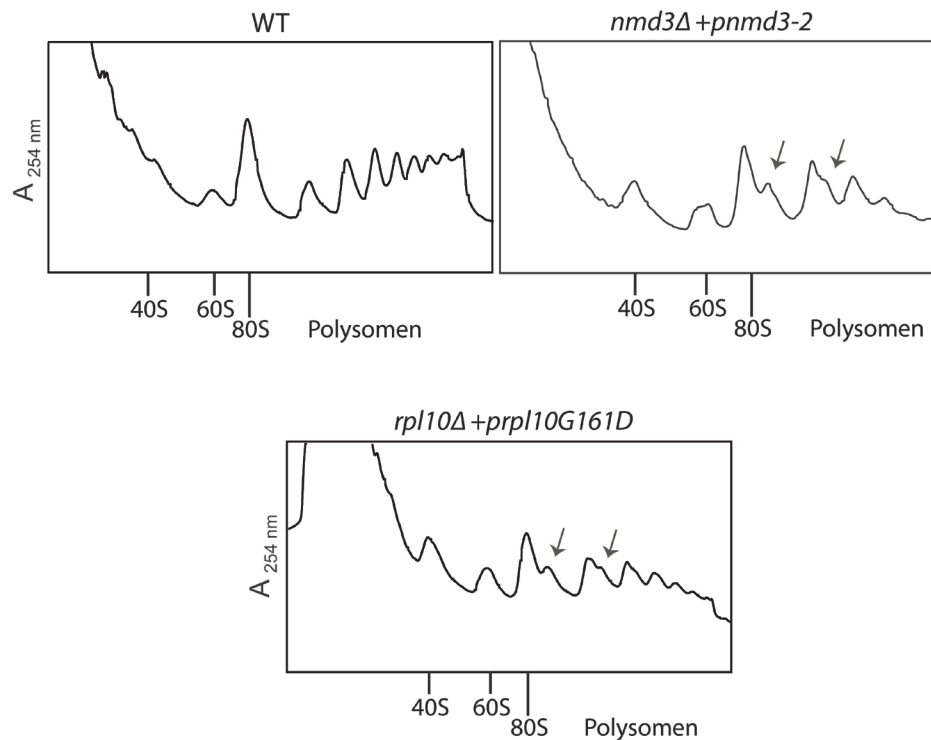
**A****B**

**Abbildung 19: Die gestörte Monosomenbildung in der Mutante *npl3Δ100* wird durch die verringerte physikalische Interaktion der ribosomalen Untereinheiten verdeutlicht. (A)** Gezeigt ist eine Western-Blotanalyse einer Ko-Immunopräzipitation von Rpl25-myc, einem ribosomalen Protein der 60S-UE. Die Detektion des Interaktionspartners Rps2-GFP (Protein des 40S-Partikels) reflektiert die Interaktion über die Bildung von 80S-Partikeln. Hem15 ist als Negativkontrolle der Interaktion untersucht worden. **(B)** Die Quantifizierung von drei Interaktionsstudien spiegelt das Verhältnis von Rps2 zu Rpl25 vergleichend zum Wildtyp (WT) wider.

Um die Gesamtanzahl an Monosomen zu analysieren, wurde eine Ko-Immunopräzipitation des 60S-Partikels über Rpl25-myc durchgeführt (Abbildung 19A). Durch die Detektion des Interaktionspartners Rps2-GFP, konnte die Menge an gebundenen 40S-Partikeln vergleichend zum Wildtyp ermittelt werden. Deutlich erkennbar ist die starke Reduktion der Verbindung von 60S und 40S in *npl3Δ100*-Zellen um ca.70% (Abbildung 19B). Daß eine Störung in der Formierung von Monosomen, resultierend in einem Polysomenprofil mit Schulterbildung, auch in anderen Mutanten beobachtet werden kann, zeigt Abbildung 20. In dieser sind exemplarisch Polysomenprofile der Mutanten *rpl10(G161D)* und *nmd3-2* mit einem Schulter-Phänotyp dargestellt. Das ribosomale Protein Rpl10 befindet sich an der unlöslichen Seite des 60S-Partikels (Spahn et al., 2001) und trägt unter anderem zur Anheftung beider

Untereinheiten an mRNA bei (Eisinger et al., 1997). Mutationen in *RPL10* können aber auch Defekte in der Prozessierung von 60S-Partikeln auslösen (Gadal et al., 2001).

Die Mutante *nmd3-2* ist durch 60S-Exportdefekte charakterisiert (Gadal et al., 2001).



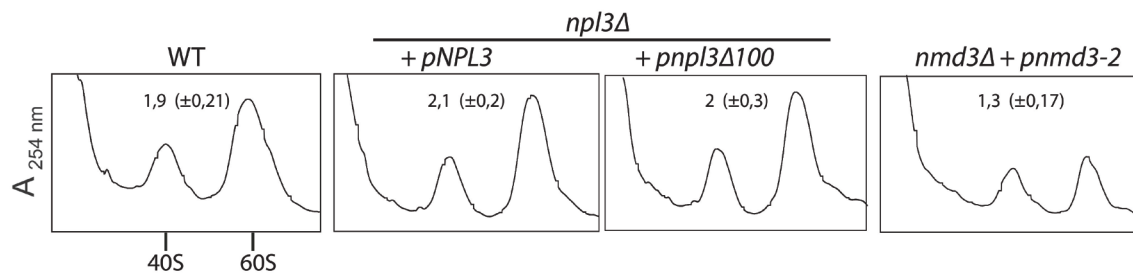
**Abbildung 20: Verschiedene Mutanten zeigen einen Schulter-Phänotyp im Polysomenprofil.** Die Absorption (254 nm) von Zelllysaten nach Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation ist grafisch gezeigt. Es werden Ribosomenprofile von der Mutante *rpl10(G161D)* mit einem Schaden in der Verbindung von Untereinheiten, die Mutante *nmd3-2* mit Defekten in Reifung und Export der 60S-UE und des Wildtyps gezeigt. Die Stämme wurden vor der Lyse für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Pfeile kennzeichnen zusätzliche Schultern an den dominierenden Peaks.

Beide Mutanten belegen, daß neben einer gestörten Verbindung von 40S- und 60S-Ribosomen an mRNA auch ein Mangel an translationskompetenten 60S-Partikeln zu verlangsamten Translationsinitiationsereignissen führen kann.

### 3.5.2 In *np13Δ100*-Zellen sind keine Reifungsdefekte von 60S-Ribosomen erkennbar

Um die genauen Ursachen für die verlangsamten Initiationsereignisse in *np13Δ100*-Zellen zu ergründen, wurde analysiert, ob ein genereller Mangel an 60S-Partikeln in diesen

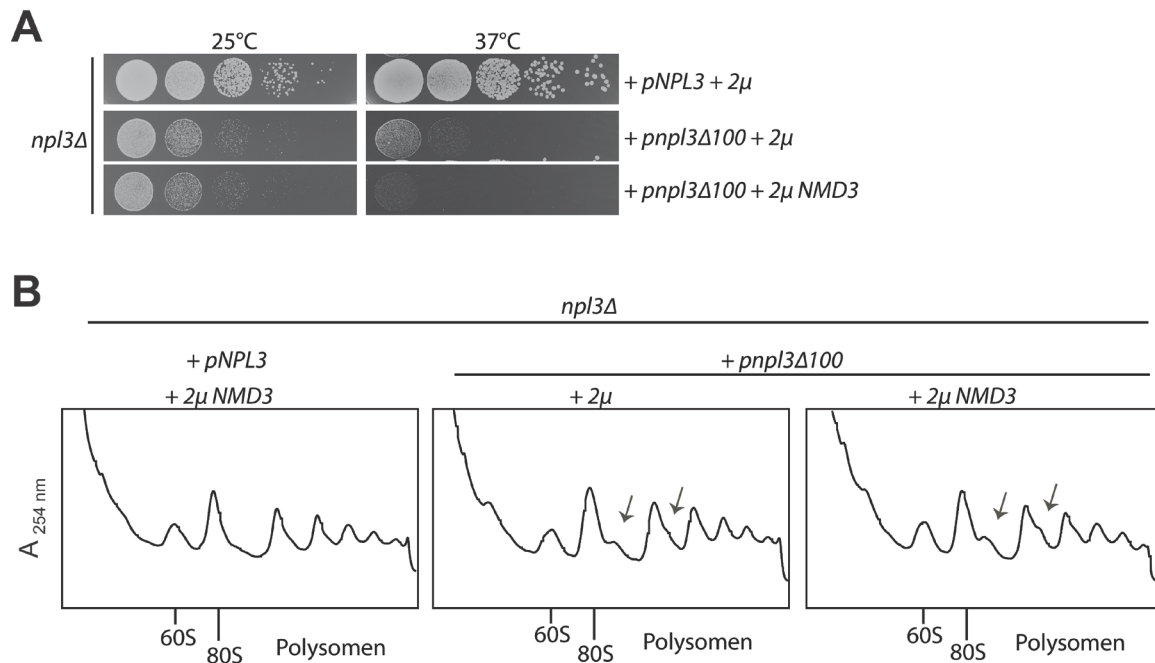
Zellen vorherrscht. Dazu wurden die ribosomalen Untereinheiten über Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation unter Zugabe von EDTA aufgetrennt.



**Abbildung 21: Das Verhältnis der ribosomalen Untereinheiten in *np/3Δ100*-Zellen ist wildtypisch.** 80S-Partikel wurden über den Zusatz von EDTA in ribosomale Untereinheiten dissoziiert und die Zelllysate nach einer Saccharose-Dichtengradienten-Zentrifugation auf Absorption bei 254 nm überprüft. Des weiteren ist das Verhältnis der Peakfläche von 60S zu 40S mit Standardabweichung von 4 Experimenten gezeigt (Zahl in der Box).

Bei hohen Konzentrationen von EDTA dissoziieren 80S-Partikel in ihre Untereinheiten und können über die Bestimmung der Peakfläche zueinander ins Verhältnis gesetzt werden. So hat der Wildtyp ein 60S/40S-Verhältnis von rund 2, während die 60S-Exportmutante *nmd3-2* durch den Mangel an 60S-Partikeln nur einen Wert von 1,3 aufweist (Abbildung 21). Die *NPL3*-Mutante *np/3Δ100* dagegen zeigt kein reduziertes 60S/40S-Verhältnis. Dies bedeutet, daß die Mutante nicht durch einen ribosomalen Abbau von der 60S-Untereinheit durch fehlende Reife- oder Exportschritte gekennzeichnet ist.

In Übereinstimmung mit der wildtypischen Lokalisation der 60S-Partikel in *np/3Δ100*-Zellen (Abbildung 14A) und den Ergebnissen von Abbildung 21 kann keine Beeinträchtigung des Exports von oder der Menge an 60S-Partikeln beobachtet werden. Dennoch wurde getestet, ob die Überexpression von *NMD3* potentiell Defekte in *np/3Δ100*-Zellen aufheben oder schmälern kann. Jedoch konnte weder ein Wachstumsvorteil (Abbildung 22A) noch eine Änderung im Polysomenprofil (Abbildung 22B), beispielsweise durch Schwächung der Schulterbildung, in *np/3Δ100*-Zellen durch eine hohe Kopienzahl von *NMD3* identifiziert werden.

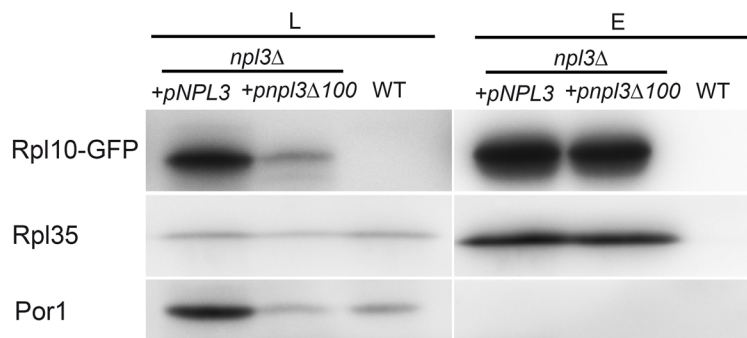


**Abbildung 22: Der Phänotyp von *npI3Δ100*-Zellen ändert sich nicht durch unterstützten 60S-Export. (A)** Im Wachstumstest erhält die Mutante *npI3Δ100* keinen Wachstumsvorteil durch die Überexpression von *NMD3* im Vergleich zu Zellen die einen Leervektor tragen (2μ). **(B)** Die Absorption (254 nm) nach einer Dichtegradientenzentrifugation wurde ermittelt. Die Schulterbildung (Pfeile) in der Mutante *npI3Δ100* ist trotz Überexpression von *NMD3* im Vergleich zum Leervektor (2μ) unverändert. Die Zellen wurden vorher bei 37°C für 1h inkubiert.

Da eine Formation von Schultern im Polysomenprofil auch aus zytoplasmatischen Prozessierungsdefekten des 60S-Partikels resultieren kann, wurde dieser Aspekt weiter untersucht. Im Zytoplasma unterliegt das 60S-Partikel noch einigen aufeinanderfolgenden Reifungsschritten bevor es die endgültige Translationskompetenz durch die Dissoziation von Nmd3 mithilfe von Lsg1 erhält (Lo et al., 2010). Durch dieses Ereignis wird einerseits die Position auf dem 60S-Partikel für die Verbindung mit der 40S-Untereinheit frei, die vorher durch Nmd3 blockiert war und andererseits wird sehr wahrscheinlich das ribosomale Protein Rpl10 im Partikel stabilisiert (Hedges et al., 2005; Sengupta et al., 2010).

Um die vollständige Reifung des 60S-Partikels in der Mutante *npI3Δ100* zu analysieren, wurde der Einbau von Rpl10 kontrolliert. Eine Ko-Immunopräzipitation von Rpl10-GFP und die Detektion des ko-präzipitierten, ribosomalen Strukturproteins Rpl35 sollte Aufschluss über die Verbindung von Rpl10 mit anderen ribosomalen Proteinen der großen Untereinheit im Komplex geben. Abbildung 23 demonstriert keine Unterschiede der Rpl10-Rpl35-Interaktion in *npI3Δ100*-Zellen im Vergleich zum Wildtyp.



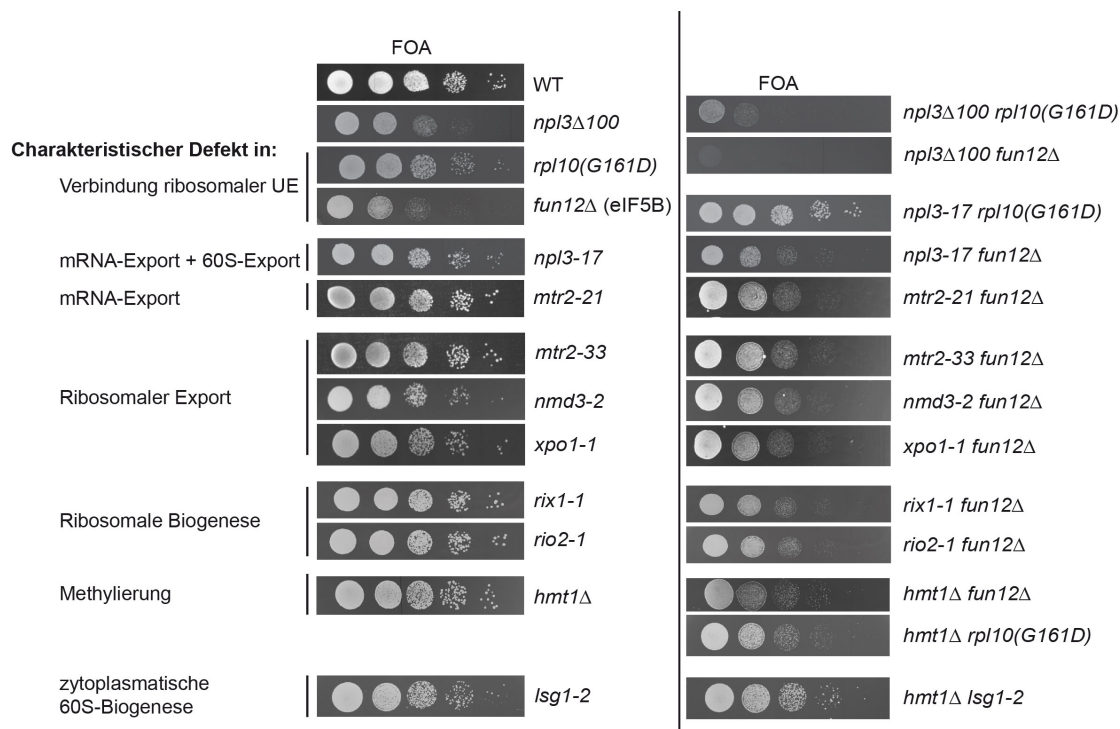


**Abbildung 23: Der Einbau von Rpl10 in zytoplasmatische 60S-Partikel in *npl3Δ100*-Zellen ist ungestört.** Es wurde mithilfe der Ko-Immunopräzipitation von GFP, unter der Zugabe von RNase, Rpl10-haltige Partikel gereinigt und auf die Interaktion mit der 60S-ribosomalen Strukturkomponente Rpl35 untersucht. Diese Interaktion ist in Zellen mit Vollängen-Npl3 und dem verkürzten *npl3Δ100* unverändert. Die Lyse der Zellen erfolgte nach einer Temperaturveränderung auf 37°C für 1h.

Die Daten weisen stark daraufhin, daß die Mutante *npl3Δ100* keine Defekte im Transport oder der zytoplasmatischen Reifung besitzt, aber trotzdem durch verlangsamte Translationsereignisse, sichtbar an der Schulterbildung im Polysomenprofil, charakterisiert ist.

### 3.6 NPL3 kann Störungen in der Monosomenbildung kompensieren

Die vorangegangenen Ergebnisse deuten auf eine Funktion von Npl3 in der Formation von 80S-Partikeln während der Translationsinitiation hin. Um die Hinweise auf die Bedeutung von Npl3 in der Verbindung von ribosomalen Untereinheiten zusätzlich zu stützen, wurden genetische Analysen durchgeführt. Um genetische Interaktionen zu identifizieren, wurden Doppelmutanten hergestellt, wobei ein defektes Gen mit einem *URA3*-haltigen Vektor komplementiert wurde. In der folgenden Wachstumsanalyse wurde der Verlust dieses Vektors durch Selektion der Zellen auf FOA-Platten vollzogen (Abbildung 24). Dabei wurde das Wachstum der Einzelmutanten (links) mit dem Wachstum der Doppelmutanten (rechts) verglichen. Dieser Vergleich belegt eine genetische Interaktion von *NPL3* mit Faktoren, die in der Verbindung von ribosomalen Untereinheiten mitwirken (*FUN12*, *RPL10*). So sind die Doppelmutanten *npl3Δ100 rpl10(G161D)* und *npl3Δ100 fun12Δ* stark wachstumseingeschränkt oder nicht lebensfähig. Im Gegensatz zu der Kombination der Mutation *npl3-17*, verantwortlich für mRNA- und 60S-Exportdefekte, mit *rpl10(G161D)* oder *fun12Δ*, die zu keinem verminderten Wachstum führt.



**Abbildung 24: Die Kombination von Defekten in der Verbindung ribosomaler Untereinheiten mit einer fehlenden Interaktion von Npl3-Molekülen ist tödlich für Zellen.** Der Wachstumstest auf FOA(5-Fluoroorotic acid)-Platten demonstriert eine spezifische, genetische Interaktion zwischen den Mutanten der Translationsinitiation (*rpl10(G161D)*, *fun12Δ*) und *npl3Δ100*. Dagegen hat die Kombination von mRNA-Export-, ribosomaler Export- oder ribosomaler Prozessierungsmutanten mit *rpl10(G161D)* oder *fun12Δ* keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Zellen im Vergleich zu den Einzelmутanten (links). Weiterhin zeigt die Methylierungsmutante *hmt1Δ* in Kombination mit *fun12Δ* und *lsg1-2* keine und in Kombination mit *rpl10(G161D)* nur leichte Wachstumsdefizite. Die Platten wurden bei 25°C für 3 Tage inkubiert. (Die Daten stammen aus dieser Arbeit und aus der Doktorarbeit von Thomas Groß, AG Krebber.)

Zusätzlich ist das Wachstum der Doppelmutanten aus *fun12Δ* oder *rpl10(G161D)* mit weiteren mRNA- bzw. 60S-Exportmutanten (*mtr2-21* bzw. *mtr2-33*, *nmd3-2* oder *xpo1-1*) oder Mutanten mit Prozessierungsdefekten ribosomaler Untereinheiten (*rix1-1*, *rio2-1*) unbeeinflusst im Vergleich zu den Einzelmутanten.

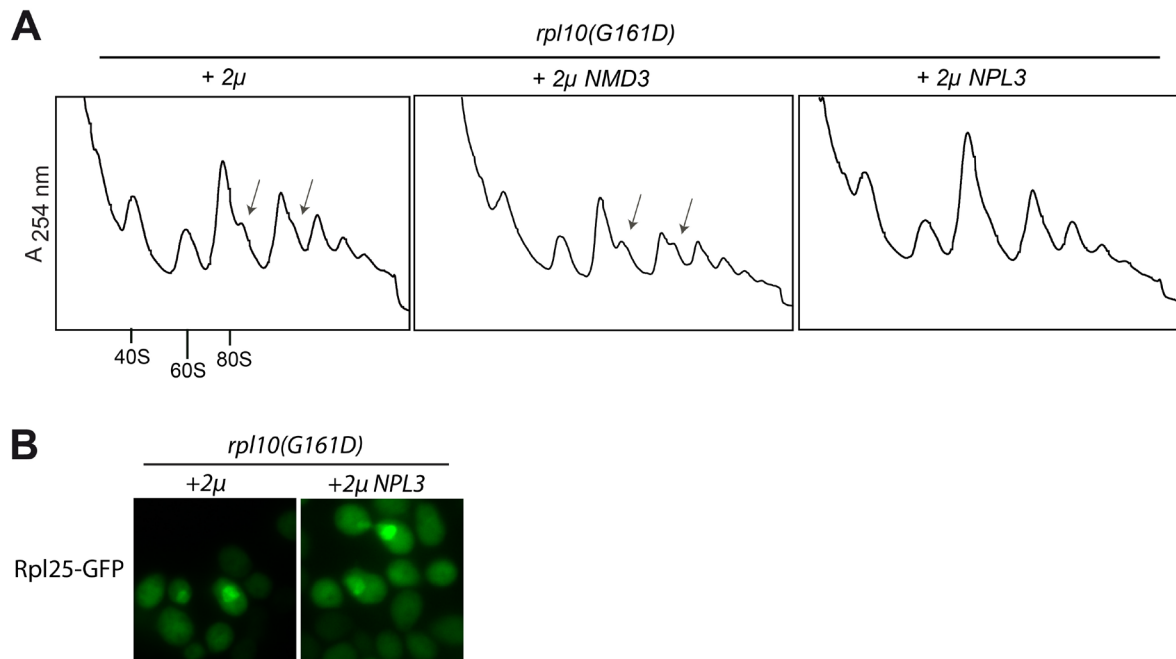
Die Methyltransferase-Mutante *hmt1Δ* zeichnet sich durch die fehlende Methylierung einiger mRNA-bindender Proteine (u. a. Npl3) aus. In Kombination mit der Translationsinitiationsmutante *fun12Δ* oder der Mutante *lsg1-2*, mit Defekten in der zytoplasmatischen Ablösung von Nmd3 vom 60S-Partikel, zeigt *hmt1Δ* keine Wachstumsdefizite. Leichte Wachstumseinschränkungen sind allerdings bei der Doppel-Mutante *hmt1Δ rpl10(G161D)* zu erkennen (Abbildung 24).

Die Interaktion von *NPL3* mit *RPL10* oder *FUN12* scheint jedoch spezifisch auf den Verlust der Npl3-Npl3-Interaktion (in *npl3Δ100*) zurückführbar zu sein, jedoch weder auf mRNA-

oder 60S-Export-Defekte (z.B. in *np13-17*), noch auf Methylierungsmangel von *Npl3* (*hmt1Δ*).

Aufgrund der Spezifität der genetischen Interaktion kam die Frage auf, ob *NPL3* auch spezifisch Defekte in Translationsinitiationsmutanten supprimieren kann. Dazu wurde *NPL3* auf einem Überexpressionsvektor in Wildtypzellen, in die Mutanten *rpl10(G161D)* und *fun12Δ*, sowie in Mutanten von *LSG1* eingebracht. Das Wachstum dieser Stämme wurde mit dem Wachstum der Stämme mit einem eingebrachten Leervektor verglichen (Doktorarbeit Thomas Groß, AG Krebber). Die Überexpression von *NPL3* ist in Wildtypzellen leicht toxisch, aber kann dennoch den Mutanten *rpl10(G161D)* und *fun12Δ* einen Wachstumsvorteil verschaffen, während die Mutanten von *LSG1* unbeeinflusst bleiben. Im Gegensatz dazu kann die Überexpression von *MTR2* (mRNA- und 60S-Exportfaktor) oder *NMD3* (60S-Exportfaktor) das Wachstum der Mutanten nicht begünstigen.

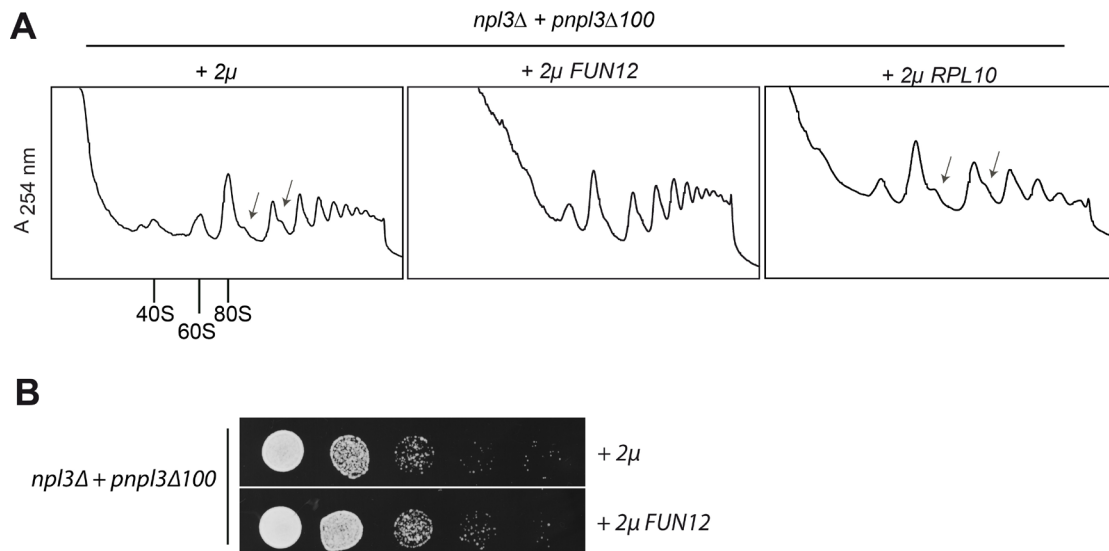
Um der Ursache der Suppression der Wachstumsdefekte der Mutanten durch eine hohe Kopienzahl an *NPL3* nachzugehen, wurde das Polysomenprofil untersucht. Es konnte allerdings kein sichtbarer Effekt auf das Polysomenprofil von *fun12Δ*-Zellen durch *NPL3* beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Das Profil dieser Zellen zeichnet sich durch einen hohen Anteil an salzsensitiven 80S-Partikeln und durch verminderte Polysomenpeaks aus (Choi, 1998). Vor Kurzem wurde neben der bekannten Funktion in der Translationsinitiation eine neue Funktion von Fun12 in der Qualitätskontrolle von 40S-Ribosomen beschrieben (Strunk et al., 2012). Durch die komplette Deletion von *FUN12* kann es zu einer Überlagerung der Defekte und deshalb zu einem mannigfaltigen Phänotyp des Polysomenprofils führen, der durch *NPL3* möglicherweise nicht zu supprimieren ist.



**Abbildung 25: *NPL3* kompensiert Defekte in der Verbindung von ribosomalen Untereinheiten in der Mutante *rpl10(G161D)*.** (A) Durch Überexpression von *NPL3* wird der Schulter-Phänotyp des Polysomenprofils von *rpl10(G161D)*-Zellen deutlich vermindert. Eine hohe Kopienzahl des 60S-Transportfaktors *NMD3* hat keinen Einfluss. Die Pfeile zeigen die Schultern an den Haupt-Peaks an. (B) Jedoch werden die Exportdefekte von 60S-Partikeln in *rpl10(G161D)*, visualisiert durch das ribosomale Protein Rpl25-GFP, nicht von der Überexpression von *NPL3* beeinflusst. Der Maßstab entspricht 5  $\mu$ m. Die Zellen aus (A)+(B) wurden bei der semi-permissiven Temperatur von 30°C über Nacht kultiviert.

Im Gegensatz dazu konnte aber eine Veränderung des Profils von *rpl10(G161D)*-Zellen durch die Überexpression von *NPL3* demonstriert werden (Abbildung 25A). Im Vergleich zu den Zellen mit Leervektor oder Überexpressionsvektor mit *NMD3*, führt die hohe Kopienzahl von *NPL3* zu einer Schwächung der Schulterbildung, was als Unterstützung in der Monosomenbildung zu interpretieren ist. Diese Unterstützung von *NPL3* wird aber nicht etwa über die Aufhebung der 60S-Misslokalisierung (Hedges et al., 2005) in *rpl10(G161D)*-Zellen kompensiert, da die nukleäre Misslokalisierung des 60S-Reporters Rpl25-GFP unverändert bleibt (Abbildung 25B).

Um zu untersuchen ob die Faktoren universell Defekte ausgleichen können, wurde die Überexpression von *FUN12* oder *RPL10* in *npl3 $\Delta$ 100*-Zellen analysiert (Abbildung 26A).



**Abbildung 26: Die Expression von *FUN12* kann den Schulter-Phänotyp im Polysomenprofil von *np13Δ100* abschwächen.** (A) Nach einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation wurden die Polysomenprofile von *np13Δ100*-Zellen ermittelt. In die Zellen wurden Überexpressionvektoren entweder mit einem Leervektor, *FUN12* oder *RPL10* eingebracht. Die Schultern sind durch Pfeile gekennzeichnet. (B) Der positive Einfluss von *FUN12* auf *np13Δ100*-Zellen wird auch durch den Wachstumsvorteil im Vergleich zum Leervektor deutlich. Die Zellen wurden bei der semi-permissiven Temperatur (30°C) über Nacht angezogen.

Interessanterweise konnte der Schulter-Phänotyp des Polysomenprofils nur durch *FUN12*, jedoch nicht durch *RPL10* gemildert werden. Zusätzlich konnte auch ein Wachstumsvorteil von *np13Δ100*-Zellen durch *FUN12* demonstriert werden (Abbildung 26B). Dieser ist allerdings nicht stark ausgeprägt.

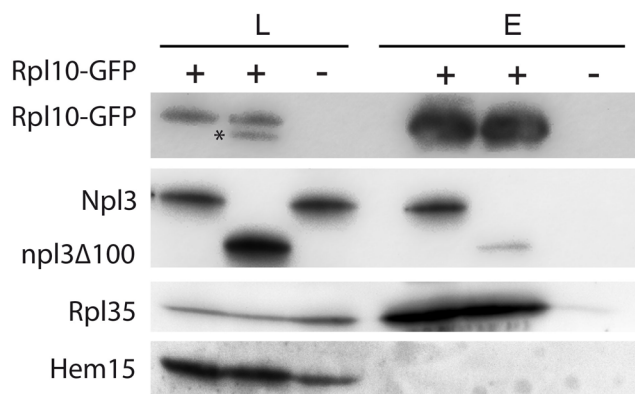
Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse ein potentielles Zusammenspiel von Npl3 mit Fun12 und Rpl10 in wichtigen Schritten der Monosomenbildung.

### 3.7 Effektive Monosomenbildung wird durch die Verbindung von Npl3 mit dem Rpl10-haltigen 60S-Partikel unterstützt

Die bisherigen Untersuchungen dokumentieren eine wichtige Funktion von Npl3 in der Zusammenführung von ribosomalen Untereinheiten an mRNA. Genetische Analysen demonstrierten, daß die Funktion von Npl3 in der Monosomenbildung wahrscheinlich mit den Faktoren Rpl10 und Fun12 in Verbindung steht.

Die Npl3-Npl3-Interaktionsmutante *np13Δ100* ist durch verlangsamte Translationsinitiationsereignisse gekennzeichnet. Worauf diese Defekte im physikalischen Sinne beruhen, sollte im Folgenden untersucht werden.

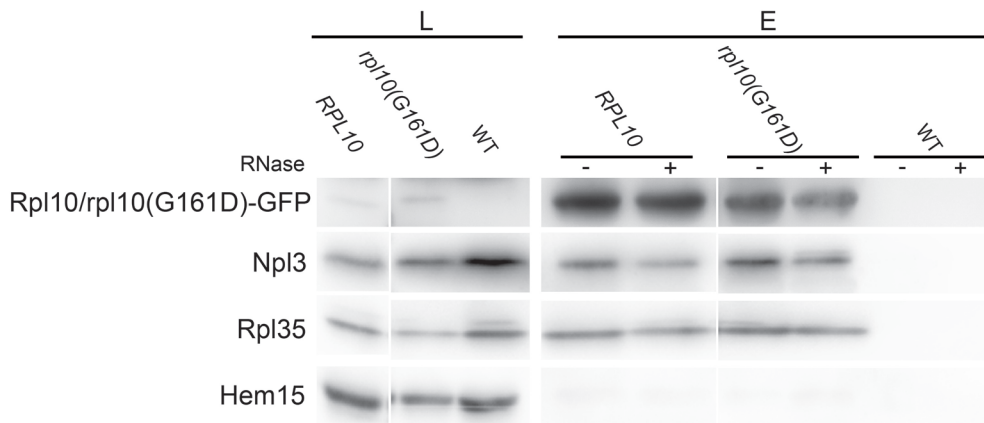
Npl3, als 60S-Exportfaktor wurde bereits im Komplex mit pre-60S-Partikeln nachgewiesen (Hackmann et al., 2011). Eine Analyse über eine mögliche zytoplasmatische Interaktion mit dem 60S-Partikel, ist allerdings noch unbeschrieben. Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurde auf die zytoplasmatischen, Rpl10-haltigen 60S-Partikel fokussiert. Das Strukturprotein Rpl10 assoziiert nach dem Export mit dem 60S-Ribosom und dessen stabile Integration gilt als einer der letzten Schritte in der 60S-Reifung (Lo et al., 2010; Sengupta et al., 2010). Eine Ko-Immunopräzipitation von Rpl10-GFP sollte Aufschluss über einen Kontakt von Npl3 mit dem zytoplasmatischen Partikel geben. Diese Interaktion konnte positiv bestätigt werden (Abbildung 27A). Wenn man allerdings die Interaktionsfähigkeit von npl3 $\Delta$ 100 zu Rpl10 untersucht, fällt auf, daß diese im Vergleich zum Wildtyp-Protein Npl3 stark vermindert ist. Die Interaktion von Rpl10 und Rpl35 über das 60S-Partikel bleibt jedoch unverändert, belegend für die Präzipitation ganzer 60S-Partikel und nicht nur freivorliegendem, nicht inkorporiertem Rpl10.



**Abbildung 27: Die Interaktionsmutante npl3 $\Delta$ 100 besitzt eine starke Störung in der Bindung an Rpl10-haltige 60S-Partikel.** Die Western-Blotanalyse der Ko-Immunopräzipitation von Rpl10-GFP belegt einen RNA-unabhängigen Kontakt mit dem Volllängen-Protein Npl3. Diese Interaktion ist stark reduziert im Fall von npl3 $\Delta$ 100. Dagegen bleibt die Interaktion von Rpl10 mit Rpl35 unverändert. Die Detektion von Hem15 dient als Kontrolle der Spezifität des Experiments. Den Reaktionen wurde RNaseA zugegeben. (\*= unspezifisches Signal)

In diesem Zusammenhang wurde auch die potentielle Interaktion zwischen Npl3 und Fun12 analysiert. Es konnte jedoch mittels Ko-Immunopräzipitation kein Kontakt zwischen Npl3 und Fun12 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), obwohl die genetischen Analysen stark für die gegenseitige Unterstützung in ihren Funktionen sprechen (Abbildung 26). Entweder assoziieren beide Proteine nicht zusammen in demselben Komplex oder die Interaktion ist transient und deswegen nicht detektierbar.

Um einen weiteren Einblick in die Natur der Interaktion von Npl3 und Rpl10 in der Mutante *rpl10(G161D)* mit Monosomen-Defekten (Schulter-Profil) zu erhalten, wurde eine vergleichende Ko-Immunopräzipitation zum Wildtyp unternommen (Abbildung 28).

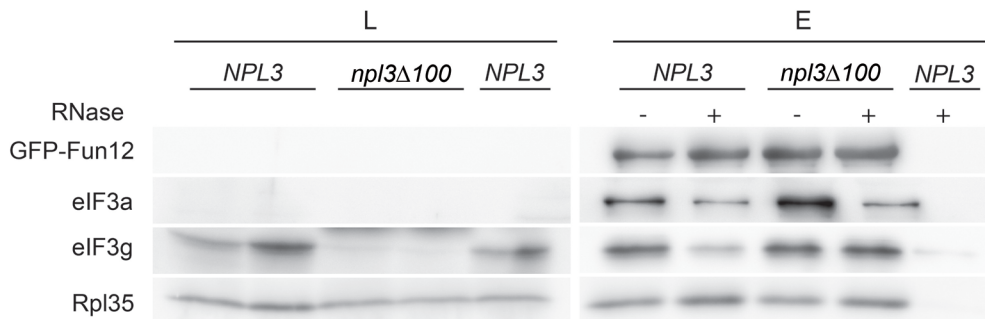


**Abbildung 28: Das Mutantenprotein *rpl10(G161D)* und Npl3 bleiben auch nach der nicht-permissiven Temperatur mit dem 60S-Partikel assoziiert.** Die Western-Blotanalyse der Ko-Immunopräzipitation von Rpl10- oder *rpl10(G161D)*-GFP demonstriert keinen Unterschied in der Interaktionsstärke zu Npl3 oder der 60S-Strukturkomponente Rpl35. Die Detektion von Hem15 diente als Negativkontrolle. (L= Lysat, E= Eluat)

Trotz des Anlegens der für *rpl10(G161D)* restriktiven Temperatur von 37°C und der folgenden Defekte in der Monosomenbildung (Abbildung 20) scheint weder das Protein *rpl10(G161D)* durch eine mögliche Missfaltung vom 60S-Partikel zu dissoziieren, noch der Kontakt von Npl3 an das *rpl10*-assoziierte 60S-Partikel gestört zu sein. Diese Beobachtungen lassen schlußfolgern, daß die Defekte der Monosomenbildung in der Mutante *rpl10(G161D)* nicht durch eine fehlende Assoziation von Npl3 an das Rpl10-inkorporierte 60S-Partikel hervorgerufen wird, sondern womöglich über eine strukturelle Veränderung des Proteins *rpl10(G161D)*, was zu einer inkompatibleren Oberflächenbeschaffung und zu einer verminderten Affinität zu 40S-Partikeln führen könnte.

Die stark verminderte Interaktion zwischen *npl3Δ100* und Rpl10, wirft die Frage auf, ob auch andere Interaktionen zwischen Proteinen in *npl3Δ100*-Zellen beeinflusst sind. Ob beispielsweise die Assoziation von Fun12 (eIF5B) in Translationsinitiations-Komplexe ungestört ist. Dazu wurde GFP-Fun12 immunopräzipitiert und in der Verbindung zu dem Faktor eIF3 in Wildtyp- und *npl3Δ100*-Zellen untersucht. Die Abbildung 29 zeigt eine Ko-Immunopräzipitation von GFP-Fun12 und eine unverminderte Verbindung zu eIF3a, eIF3g

und Rpl35 in *np13Δ100*-Zellen im Vergleich zur Wildtypsituation. Es scheint also die Inkorporation von Fun12 in Initiationskomplexe in der Mutante *np13Δ100* generell möglich und unverändert zu sein.



**Abbildung 29: Der Einbau von Fun12 (eIF5B) in Initiationskomplexe scheint in *np13Δ100*-Zellen nicht gestört zu sein.** Wildtyp- und *np13Δ100*-Zellen zeigen eine vergleichbare Interaktion von Fun12-GFP (eIF5B) mit den Initiationsfaktoren eIF3a und eIF3g, sowie mit dem 60S-Protein Rpl35. Die Zellen wurden vor der Ernte bei 37°C für 1 h inkubiert. Gezeigt ist eine Western-Blotanalyse der Ko-Immunopräzipitation von GFP-Fun12. Die Detektion von Hem15 diente als Negativkontrolle. (L= Lysat, E= Eluat)

Diese Resultate unterstützen das Modell, daß eine effiziente Monosomenbildung über eine funktionale Npl3-Rpl10-Interaktion am 60S-Partikel gewährleistet wird. Zusätzlich scheint der Kontakt von Npl3 mit Rpl10 von der Interaktion zwischen Npl3-Molekülen abhängig zu sein.

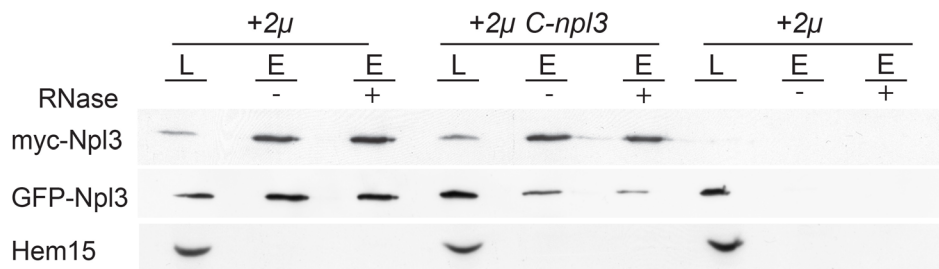
### 3.8 Eine Überexpression der Interaktionsdomäne im Kern stört die Npl3-Npl3-Interaktion und die Monosomenbildung

Die Bildung von Monosomen wird durch Npl3-Npl3-Interaktion unterstützt. Wenn die Interaktion unterbunden wird, kommt es zu Defekten in der Verbindung von ribosomalen Untereinheiten. Ausgehend von diesen Ergebnissen war es interessant zu untersuchen, ob die Expression der Interaktionsdomäne für Npl3-Npl3-Verbindungen eine solche stören kann.

Dazu wurde der C-Terminus von Npl3 in Wildtyp-Zellen überexprimiert und die Zellen auf unterschiedliche Phänotypen untersucht. Zuerst wurde die Stärke der Npl3-Npl3-Interaktion *in vivo* über die Ko-Immunopräzipitation von myc-Npl3 und der Nachweis von GFP-Npl3 analysiert.

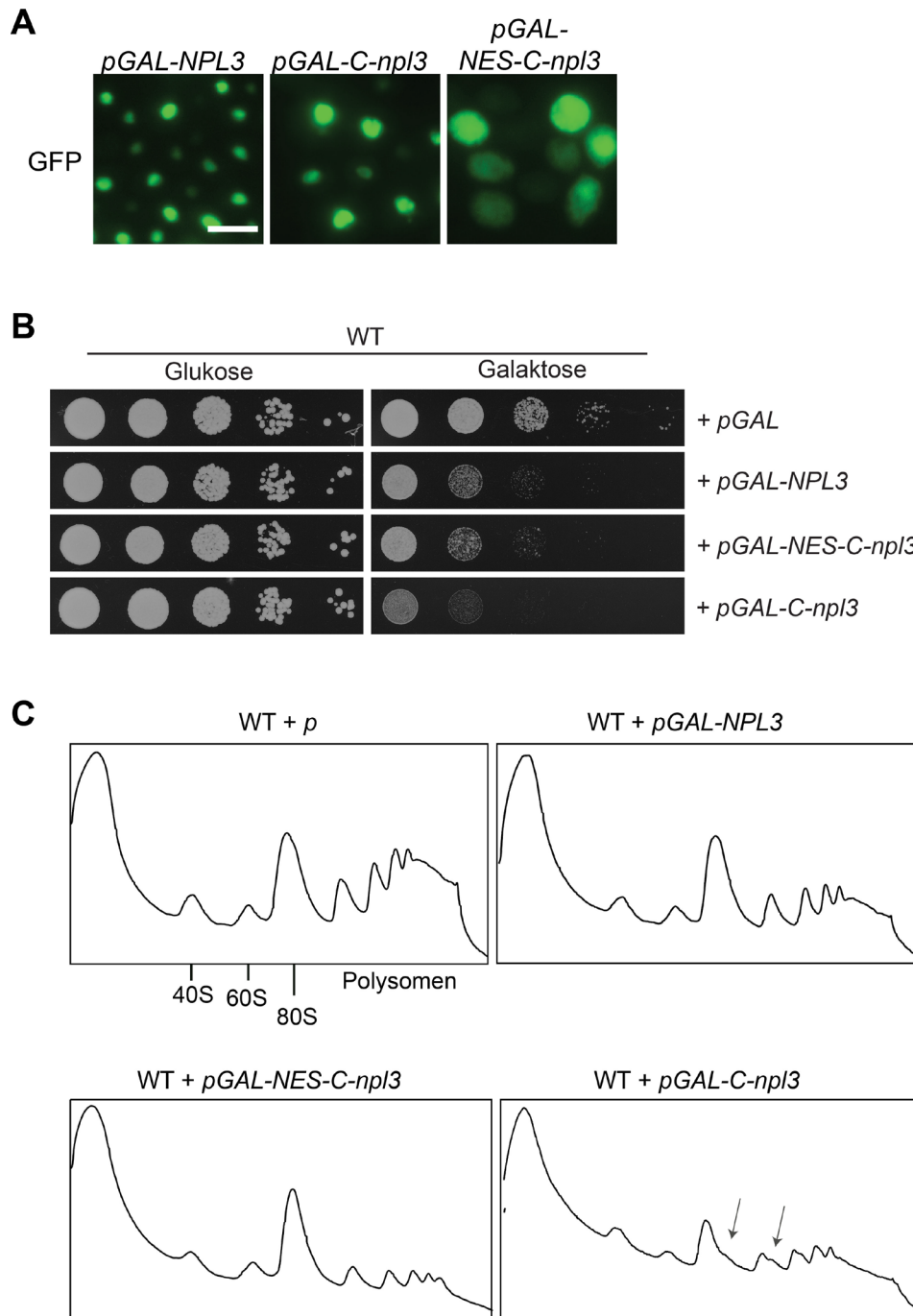


In Gegenwart der Expression von *C-npl3* war eine deutlich geringere Interaktion zwischen den beiden Npl3-Molekülen (Abbildung 30) nachweisbar, im Gegensatz zu Zellen mit einem Leervektor (2 $\mu$ ). Dies beweist eine kompetitive Wirkung des C-Terminus auf Npl3-gebundene Komplexe. Ob die Störung sich direkt auf Npl3-Moleküle oder auf ganze Komplexe auswirkt, kann durch die *in vivo* Ko-Immunopräzipitation nicht genau festgelegt werden.



**Abbildung 30: Die Interaktion von Npl3-Molekülen wird durch Überexpression der Npl3-Interaktionsdomäne gemindert.** Mithilfe der Ko-Immunopräzipitation von myc-Npl3 aus Wildtyp-Zellen wurde der Interaktionspartner GFP-Npl3 nachgewiesen. Gezeigt ist eine Western-Blot-Analyse. Die Interaktion ist in Zellen, die den Überexpressionsvektor mit dem C-Terminus (*C-npl3*) tragen, stark reduziert. Die RNase-Zugabe ist im Bild gekennzeichnet. Hem15 wurde als unspezifischer Interaktionspartner detektiert.

Da die C-Domäne von Npl3 das Signal für den Kernimport über den Importrezeptor Mtr10 trägt (Senger et al., 1998), lokalisiert das Peptid im Kern (Abbildung 31A). Weil aber der Prozess der Translation und somit auch die Funktion der Npl3-Npl3-Verbindungen in der Monosomenbildung im Zytoplasma stattfindet, sollte das Peptid (*C-npl3*) im Zytoplasma angereichert werden um dort eine Störung zu verursachen. Dafür wurde N-terminal ein Kernexportsignal (NES= *nuclear export signal*) fusioniert, was zu einer zytoplasmatischen Verteilung von NES-*C-npl3* führte (Abbildung 31A). Die Überexpression von *NPL3* wirkt toxisch auf Wildtypzellen. Interessanterweise wirkt sich auch die Überexpression des C-Terminus von Npl3 (*C-npl3*) negativ auf das Zellwachstum aus (Abbildung 31B), allerdings stärker als bei *NPL3*. Diese Verstärkung wird aber durch die Fusion des NES (NES-*C-npl3*) wieder aufgehoben (Abbildung 31B). Zusätzlich zeigten auch nur Zellen mit Überexpression der kernlokalisierten C-Domäne (ohne NES) einen Defekt in der Monosomenbildung, reflektiert durch den Schulter-Phänotyp im Polysomenprofil (Abbildung 31C). Wobei das Profil der Zellen mit NES-*C-npl3*-Vektor sich dem von Zellen mit *NPL3*-Vektor ähnelt.



**Abbildung 31: Die Störung der Interaktion zwischen Npl3-Molekülen im Kern führt zur erhöhten Toxizität und zur reduzierten Bildung von Monosomen an mRNA. (A)** Galaktose-induzierbare GFP-Fusionen der *NPL3*-Konstrukte zeigen eine Kernlokalisierung von Npl3 und C-npl3 im Wildtyp. Der C-Terminus kann ins Zytoplasma lokalisiert werden, wenn zusätzlich ein NES (nuclear export signal) fusioniert ist. Der Maßstab kennzeichnet 5  $\mu$ m. **(B)** Die Wachstumsanalyse von Wildtypzellen auf Galaktose-haltigem Medium demonstriert eine erhöhte Toxizität bei Überexpression von *C-npl3* im Vergleich zur NES-fusionierten Version *NES-C-npl3* oder *NPL3*. Das Wachstum auf Glukose dient als Kontrolle der aufgetropften Zellmenge. **(C)** Nur der kernlokalisierte C-Terminus (*C-npl3*) kann in hoher Kopienzahl einen Schulter-Phänotyp des Polysomenprofils von Wildtypzellen hervorrufen. Das Volllängenprotein Npl3 oder der zytoplasmatisch lokalisierte C-Terminus (*NES-C-npl3*) dagegen lösen diesen Phänotyp nicht aus. Schultern sind durch Pfeile verdeutlicht.

---

Eine Störung der Monosomenbildung, reflektiert durch ein ähnliches Profil wie in *np13Δ100*, kann also nur von der kernlokalisierten C-Domäne hervorgerufen werden und scheint in einen größeren Wachstumsnachteil für die Zellen zu resultieren. Zusammen mit der Aussage, daß eine Npl3-Npl3-Interaktion auch im Kern vorkommt ( Abbildung 11), liegt es nahe, daß die Npl3-Npl3-Verbindung im Kern ausgebildet wird und auch nur dort gestört werden kann.

## 4 Diskussion

In vielzelligen Organismen ist eine Gruppe von Serine-Arginin-reichen Proteinen (SR-Proteine) als Komponenten der Splicing-Maschinerie beschrieben worden. Über ihre Fähigkeit mRNA zu binden, wirken sie als Splicing-Regulatoren, besonders im alternativen Splicing, und unterstützen somit wichtige Prozesse in der Genexpression. In höheren Eukaryoten scheinen SR-Proteine über ihre nukleären Funktionen an das Kernkompartiment gebunden zu sein. Drei Ausnahmen existieren jedoch: SRp20, 9G8 und ASF/SF2, die als pendelnde mRNA-Transportfaktoren identifiziert wurden, (Busch and Hertel, 2012; Wahl et al., 2009). Bemerkenswerterweise gibt es Anhaltspunkte, daß die pendelnden SR-Proteine neben dem mRNA-Export auch nachgeordnete Funktionen im Zytoplasma übernehmen können. So kann das Protein SFRS1 (ASF/SF2) die Translationseffizienz bestimmter mRNAs erhöhen und bildet somit einen Zusammenhang zwischen mRNA-Export und Proteinbiosynthese (Michlewski et al., 2008).

Hefe besitzt im Gegensatz zu Metazoen nur einen geringen Anteil an Intron-haltigen Genen und alternative Splicing-Ereignisse sind selten (Busch and Hertel, 2012). Interessanterweise existieren in *S. cerevisiae* dennoch drei SR-ähnliche Proteine (Hrb1, Gbp2 und Npl3), die zwischen Kern und Zytoplasma pendeln und mRNA transportieren (Häcker and Krebber, 2004; Lee et al., 1996; Windgassen and Krebber, 2003). Das am besten charakterisierte dieser Proteine ist Npl3 (Tutucci and Stutz, 2011). Frühere Ergebnisse hatten bereits Hinweise geliefert, daß die Funktion von Npl3 neben dem mRNA-Export auch mit nachfolgenden Schritten verbunden ist. So bleibt Npl3, anders als klassische nukleo-zytoplasmatische Exporter, über den mRNA-Transport hinaus mit aktiv translatierten mRNAs assoziiert (Windgassen et al., 2004).

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals eine Funktion des SR-Proteins Npl3 in der Translationsinitiation und schlägt Modelle vor wie Npl3 dabei unterstützend wirken kann. Es wurde gezeigt, daß eine Npl3-Npl3-Interaktion *in vivo* ausgebildet werden und diese Interaktion auch Zell-unabhängig *in vitro* möglich ist (Abbildung 5, Abbildung 11). Dabei ließ sich die minimale Npl3-Interaktionsdomäne auf den Proteinbereich von Position 277-364 ermitteln. Korrelierend mit dem Verlust der Npl3-Npl3-Interaktion ist *in vivo* die

Verbindung ribosomaler Untereinheiten an der mRNA gestört und folgend tritt eine geringere Translationsrate auf (Abbildung 16, Abbildung 19). Diese Störung in der Mutante *np13Δ100* zeichnet sich durch ein verändertes Polysomenprofil mit Schulterbildung aus, gleichbedeutend mit einer verlangsamten Verbindung von 60S-Untereinheiten mit den bereits mRNA-rekrutierten 40S-Partikeln (Abbildung 18). Da Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dazu beitrugen, neben der bereits bekannten Funktion im mRNA-Transport, Npl3 als Prä-60S-Exportfaktor zu identifizieren (Hackmann et al., 2011 und Abbildung 13), war ein zytoplasmatischer Mangel an 60S-Partikeln eine potentielle Ursache für die verlangsamte Monosomenbildung. Doch in *np13Δ100*-Zellen konnten weder Exporteinschränkungen noch Defekte in der Bildung des 60S-Partikels bestätigt werden (Abbildung 14, Abbildung 21). Auch ist die zytoplasmatische Reifung zur Bildung translationskompetenter 60S-Partikel, besonders der Einbau von Rpl10, funktionell (Abbildung 23). Die geringere Translationsrate von *np13Δ100*-Zellen scheint sich vielmehr durch die fehlende Rpl10-Npl3-Interaktion zu etablieren (Abbildung 27). Des weiteren konnten genetische Interaktionen zwischen *NPL3* und dem Translationsinitiationsfaktor *FUN12* (eIF5B) oder *RPL10* die Funktion von Npl3 in der Translationsinitiation stützen. Die genetische Interaktion von *FUN12* und *NPL3* ist von spezifischer Natur. Demnach entsteht kein genereller Wachstumsnachteil für Zellen, wenn eine Störung der Translationsinitiation, wie in *fun12Δ*, mit Beeinträchtigungen in mRNA- bzw. 60S-Export oder in der Prozessierung ribosomaler Untereinheiten kombiniert vorliegt (Abbildung 24 und Doktorarbeit Thomas Groß, AG Krebber). Darüber hinaus ermöglicht eine hohe Kopienzahl von *NPL3* die gestörte Verbindung ribosomaler Untereinheiten in der *RPL10*-Mutante *rp10(G161D)* zu kompensieren, während der 60S-Exportfaktor *NMD3* dies nicht vermag (Abbildung 25).

Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass die Methylierung von Npl3 durch die Methyltransferase Hmt1 keine essentielle Bedeutung für die Translationsinitiation einnimmt. So zeigt *HMT1* keine genetische Interaktion mit *FUN12* oder *LSG1* und *hmt1Δ*-Zellen keine Sensitivität auf den Translationsinhibitor Cycloheximid (Abbildung 24, Abbildung 15).

Außerdem zeigen die Resultate der vorliegenden Arbeit, daß die Überexpression der C-Domäne von Npl3 die Npl3-Npl3-Interaktion stört und folglich eine verlangsamte Monosomenbildung, ähnlich wie in der Interaktionsmutante *np13Δ100*, hervorruft

(Abbildung 30, Abbildung 31). Dies beweist, daß der C-Terminus in großer Menge toxisch wirkt und dieser Effekt wahrscheinlich aufgrund seiner kompetitiven Bindung an Npl3-Moleküle entsteht. Der Mangel an Npl3-Npl3-Interaktionen kann wiederum die Monosomenbildung benachteiligen. Obwohl die Npl3-Npl3-Interaktion in beiden Kompartimenten, Kern und Zytoplasma, erfolgen kann (Abbildung 11), findet die Ausbildung dieser Npl3-Npl3-Verbindung wahrscheinlich vorwiegend im Kern statt. So entsteht eine verlangsamte Monosomenbildung nur, wenn sich große Mengen der C-Domäne im Kern anreichern und dort schlussfolgernd die Verbindung von Npl3-Npl3 über eine kompetitive Bindung inhibieren können (Abbildung 31).

Des weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit die Bindedomäne in Npl3 für den Importrezeptor Mtr10 auf einen bestimmten Bereich im C-Terminus (Position 283-390) definiert werden (Abbildung 8). Da in Npl3 die Interaktionsdomäne für Npl3-Moleküle stark mit der Bindedomäne des Importrezeptors Mtr10 überlappt (Abbildung 8), ist anzunehmen, daß eine exklusive Bindung eines jeweiligen Partners zu einem Zeitpunkt erfolgen kann.

In diesem Zusammenhang ist die Misslokalisierung von *npl3Δ100* im Zytoplasma zu erwähnen (Abbildung 8). Obwohl das Protein nicht mehr pendeln kann, sind die nukleo-zytoplasmatischen Transportfunktionen für 60S-Partikel und mRNAs in *npl3Δ100*-Zellen nicht sichtbar beeinflusst (Abbildung 12, Abbildung 14). Um dennoch zu testen ob die Misslokalisierung einen Einfluss auf *npl3Δ100*-Zellen hat, wurde der Import von *npl3Δ100* in den Zellkern über die Fusion eines Kernlokalisierungssignals wiederhergestellt. Trotz des funktionsfähigen Imports blieben *NLS-npl3Δ100*-Zellen wachstums-defizient (Abbildung 9) und zeigten weiterhin eine Störung in der Monosomenbildung (Diplomarbeit Frederik Hinz, AG Krebber).

#### **4.1 Wildtypisches Npl3 wirkt *in vivo* nicht translationsinhibierend, sondern unterstützend für die globale Translation**

Rajyaguru und Kollegen wiesen mit *in vitro*-Experimenten eine hemmende Wirkung von wildtypischem Npl3 auf die Translationseffizienz eines Reporterkonstrukts nach (Rajyaguru et al., 2012). Entgegen der Annahme der Autoren, daß Npl3 über die direkte Bindung an eIF4G generell die Translation über den Kappenkomplex inhibiert, konnte in der vorliegenden Arbeit keine Protein-Protein-Interaktion zwischen Npl3 und eIF4G *in*

*in vivo* nachgewiesen werden (Abbildung 17). Stattdessen scheint diese Verbindung über eine RNA-Struktur, womöglich über die mRNA zustande zu kommen. Auch ist der Effekt der Deletion des C-Terminus von Npl3 nicht positiv, wie in Rajyaguru et al. 2012 beschrieben, sondern negativ für die generelle Translationseffizienz *in vivo* (Abbildung 16). Zusätzlich beschränkten sich die Arbeiten von Rajyaguru und Kollegen auf die Translation eines *in vitro* hergestellten Transkripts, währenddessen die vorliegende Arbeit die gesamte Translation der Zelle untersuchte. Dementsprechend resultieren für die Zelle globale Proteinsynthesedefekte, wenn die C-Domäne von Npl3, wie im Fall *npl3Δ100*, beeinträchtigt ist (Abbildung 16). Dies spricht wiederum für eine unterstützende Funktion von wildtypischem Npl3 in der Translation.

Widersprüchlichkeiten zwischen *in vivo* und *in vitro* Befunden sind oft auf die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen zurückzuführen. So existieren intrazelluläre Bedingungen oder Mechanismen, die Protein-Protein-Interaktionen und somit auch Prozesse wie die Translation regulieren können, diese aber in artifiziellen Reaktionen oft nicht ausreichend nachgestellt werden können. Deshalb ist es durchaus von Bedeutung, *in vitro*-Befunde mit *in vivo*-Resultaten zu ergänzen und dies als Grundlage für ein Modell eines zellulären Mechanismus zu nutzen (Hinnebusch and Lorsch, 2012).

Einen weiteren Diskussionspunkt bietet die Veröffentlichung Windgassen et al. 2004. Die Autoren beobachteten, daß ein unnatürliches Importverhalten von Npl3 (*npl3-27*), im Speziellen eine gestörte Bindung zum Importrezeptor Mtr10, eine verlängerte Assoziation von *npl3-27* mit den translatierten mRNPs hervorruft und dies mit einer Störung der Translation einhergeht. Weiterhin zeichneten sich *npl3-27*-Zellen durch eine Resistenz gegenüber Translationsinhibitoren (Paromomycin, Cycloheximid) aus. Es wird vermutet, daß dieser Phänotyp durch die verstärkte Anwesenheit des Proteins *npl3-27* an der mRNA hervorgerufen wird und elongierende Ribosomen behindert werden (Windgassen et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde dem Protein *npl3Δ100* eine fehlende Interaktion mit dem Importrezeptor Mtr10 diagnostiziert (Abbildung 8), was einen ähnlichen Arrest an translatierten mRNAs und folgende Inhibierungen hervorrufen könnte. Jedoch wurden mit der Mutante *npl3Δ100* abweichende Beobachtungen gemacht; so ist das Protein *npl3Δ100* im Vergleich zu Npl3 nicht stärker mit Polysomen assoziiert (Abbildung 10) und *npl3Δ100*-Zellen sind nicht resistent, sondern hypersensitiv gegenüber Cycloheximid

(Abbildung 15). Diese von npl3-27-abweichenden zellulären Konsequenzen belegen die Andersartigkeit der Mutation npl3 $\Delta$ 100, widerlegen eine Repression der Translation durch eine übermäßige mRNA-Assoziation und deuten eher auf eine positive Wirkung von wildtypischem Npl3 auf die Proteinsynthese hin.

Zusammenfassend ist zu erwähnen, daß eine gewisse Reprimierungsaktivität von wildtypischem Npl3 in der Translation nicht ausgeschlossen ist. Dennoch kann diese Aktivität keine globale Bedeutung *in vivo* besitzen (Abbildung 16), sondern könnte eine untergeordnete Rolle, bspw. bei Transkript-Untergruppen, einnehmen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern jedoch eine allgemein unterstützende Funktion des SR-Proteins Npl3 in der Biosynthese von Proteinen.

#### **4.2 In welchem Zusammenhang steht die Npl3-Npl3-Interaktion mit der Funktion in der Translation?**

Fest steht, daß Npl3-Moleküle ohne die C-terminalen 100 Aminosäurereste nicht mehr miteinander interagieren können (Abbildung 7). Da die Verkürzung aber einen großen Eingriff in die Proteinstruktur von Npl3 darstellt, zog diese auch eine fehlende Bindung von npl3 $\Delta$ 100 zu anderen Interaktionspartnern, wie Mtr10 und Rpl10, nach sich (Abbildung 27, Abbildung 8B). Anzumerken ist, daß durch die Deletion der 100 Aminosäurereste weitere, potentiell wichtige Bindungen an andere Strukturen gemindert sein könnten. Dennoch liefert die vorliegende Arbeit einige Hinweise, welche einen Zusammenhang zwischen der Bildung von Npl3-Npl3-Interaktionen mit der Translation herstellt. Einerseits korreliert die zunehmende Verkürzung des C-Terminus und damit der Verlust der Npl3-Npl3-Interaktion (Abbildung 7) auffallend mit zunehmenden Translationsdefekten *in vivo* (Abbildung 16). Andererseits löst die Überexpression der Interaktionsdomäne von Npl3 den gleichen Defekt in der Verbindung der ribosomalen Untereinheiten aus, wie der Verlust der Npl3-Npl3-Interaktionsdomäne (Abbildung 31C). Zusätzlich wurde durch die Überexpression der C-Domäne von Npl3 in Wildtypzellen eine Störung der Npl3-Npl3-Verbindung nachgewiesen (Abbildung 30). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die verminderte Npl3-Npl3-Interaktion einen negativen Einfluss auf die Monosomenbildung auslöst.



### 4.3 Beeinflussen Modifizierungen von Npl3 im C-Terminus die Npl3-Npl3-Interaktion oder die Translation?

Wie die Abbildung 2 darstellt, sind die meisten bekannten Modifizierungsstellen von Npl3 in seiner C-Domäne zu finden, die dem verkürzten Protein npl3Δ100 zum größten Teil fehlen. Methylierung und Phosphorylierung sind in einigen Arbeiten im Zusammenhang mit dem Transportverhalten von Npl3 dargestellt worden (1.2.1). Allerdings wirken Methylierungen auf Protein-Protein-Interaktionen allgemein eher inhibierend als unterstützend (Tutucci and Stutz, 2011). Ein Beweis dafür ist die verstärkte Interaktion zwischen unmethylierten Npl3-Molekülen in methylierungsdefekten *hmt1Δ*-Zellen (McBride et al., 2005; Yu et al., 2004). Demnach hat die Mutante npl3Δ100 durch die fehlende Methylierung keinen Nachteil Protein-Protein-Bindungen einzugehen, vielmehr ist der Interaktionsverlust zwischen npl3Δ100-Molekülen auf die fehlende Npl3-Interaktionsdomäne zurückzuführen (Abbildung 6, Abbildung 7). Einen zusätzlichen Hinweis darauf bietet die Abbildung 11, in dieser sind interagierende, unmethylierte Npl3-Moleküle in *hmt1Δ*-Zellen anhand eines GFP-Signals über Fluoreszenz-Komplementation sichtbar. Das GFP-Signal ist dabei im Vergleich zu Wildtypzellen nicht geschwächt. Weiterhin entkräftet die vorliegende Arbeit einen negativen Einfluss von unmethyliertem Npl3 auf die Translation, da der Translationsinhibitor Cycloheximid keine wachstumshemmende Wirkung auf *hmt1Δ*-Zellen besitzt (Abbildung 15) und *HMT1* keine genetische Interaktion mit *FUN12* oder *LSG1* zeigt (Abbildung 24). Allerdings ist ein leichter Wachstumsdefekt von *hmt1Δ rpl10(G161D)*-Zellen anzumerken (Abbildung 24). Da Hmt1 die hauptsächliche Arginin-Methyltransferase in Hefe darstellt, besitzt es viele Methylierungssubstrate (Gary et al., 1996). Anscheinend entstehen dadurch Beeinträchtigungen, die in Kombination mit Defekten der Mutation *rpl10(G161D)* ein Wachstumsdefizit auslösen. Diese Störungen sind aufgrund der fehlenden Sensitivität auf Cycloheximid, wahrscheinlich nicht auf die Translation zurückzuführen (Abbildung 15). Auch hat die Protein-Methylierung durch Hmt1 keine essentielle Bedeutung für das Zellwachstum, da *hmt1Δ*-Zellen keine Wachstumseinschränkungen zeigen (Abbildung 15). Neben Methylierungsstellen sind auch Phosphorylierungsstellen von Npl3 nachgewiesen worden (1.2). Die einzige Phosphorylierungsstelle von Npl3, die bisher gut charakterisiert wurde, liegt im äußersten C-Terminus an Position S411 (Gilbert et al., 2001). Durch diese

C-terminale Position fehlt dieser Serinrest aber bereits in solchen Mutanten von Npl3, die keine Interaktions- bzw. Translationsdefekte aufweisen (*npl3Δ25* und *npl3Δ50* in Abbildung 7 und Abbildung 16). Also kann man auch hier einen essentiellen Einfluss der Phosphorylierungsstelle auf die Npl3-Npl3-Interaktion sowie die zytoplasmatische Funktion in der Translation verneinen.

Daß Modifizierungen von Npl3 jedoch einen gewissen Anteil an der Regulation seiner zytoplasmatischen Funktion bzw. der Translation leisten können, kann nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.4 Welche Funktion hat Npl3 in der Unterstützung der Translation?

Offensichtlich unterliegen *npl3Δ100*-Zellen einer globalen Reduktion der Proteinneusynthese, da nicht nur wenige Proteine, sondern der gesamte Proteinhaushalt betroffen ist (Abbildung 16). Schlussfolgernd muss in dieser *NPL3*-Mutante ein Prozess defekt sein, der Auswirkungen auf eine große Menge an translatierten mRNAs hat. Nach dem bisherigen Kenntnisstand über die charakteristischen Funktionen von Npl3 könnten auch Defekte im Transport von poly(A)<sup>+</sup>RNAs und 60S-Partikeln in das Zytoplasma diesen Effekt erklären (Abbildung 13 und Hackmann et al., 2011; Lee et al., 1996). Dennoch konnte in der vorliegenden Arbeit keine Störung des Exports beider Transportcargos beobachtet werden (Abbildung 12, Abbildung 14). Demnach weist der Schulter-Phänotyp des Polysomenprofils von *npl3Δ100*-Zellen auf eine Störung in der Verbindung des 60S-Partikels mit der an die mRNA rekrutierten 40S-Untereinheit und somit auf eine beeinflusste Translationsinitiation hin (Abbildung 18). Die Initiation gilt als einer der best-reguliertesten Prozesse in der Translation, dabei steht in vielen Regulationsmechanismen die Rekrutierung des 43S-PICs an die mRNA, also frühe Initiationsschritte, im Mittelpunkt (Jackson et al., 2010). Jedoch weist der Schulter-Phänotyp eines Polysomenprofils, wie in *npl3Δ100*-Zellen, auf Defekte nach der Rekrutierung der 40S-Untereinheit an die mRNA hin. Daß die Rekrutierung von 40S-Partikeln funktional ist, unterstützt ebenso die unverminderte Bildung von Initiationskomplexen durch die intakte Interaktion zwischen Fun12 (eIF5B) und eIF3-Komponenten (Abbildung 29). Da Fun12 erst spät an den Initiationskomplex nach der 40S-Anlagerung assoziiert (Hinnebusch and Lorsch, 2012), zeigen die Ergebnisse, daß eine grundlegende Assemblierung von Assoziationskompetenten 43S-Partikeln in *npl3Δ100*-Zellen gewährleistet ist. Demnach käme eine

Funktion von Npl3 in nachgeschalteten Prozessen der Initiation, wie Scanning, AUG-Erkennung oder die Verbindung ribosomaler Untereinheiten zum Monosom, in Betracht. Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise auf eine Verbindung der Funktion von Npl3 und Fun12. Die Abschwächung der Schulterbildung im Polysomenprofil von *npl3Δ100*-Zellen durch die Überexpression von *FUN12* (Abbildung 26A) unterstützt genauso die Deutung einer Funktionsähnlichkeit von Npl3 und Fun12, wie die spezifische Wachstumsförderung von *fun12Δ*-Zellen durch die erhöhte Expression von *NPL3* (Doktorarbeit Thomas Groß, AG Krebber). Für diese Annahme wurden im Rahmen dieser Arbeit potentielle Interaktionen zwischen Npl3 und Fun12, sowie mit Initiationsfaktoren verschiedener Initiations-Phasen untersucht. Jedoch konnte keine beständige Interaktion zwischen Npl3 und Komponenten der Initiationskomplexe mittels Ko-Immunopräzipitationen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist die Assoziation von Npl3 mit Initiationsfaktoren nur transient und deswegen schwer zu detektieren. Die Stabilisierung potentieller Komplexe über fixierenden Agenzien könnte mehr Aufschluss darüber bringen, in welchem Umfang Npl3 mit Initiationskomplexen interagiert.

#### **4.4.1 Der Zusammenhang zwischen Npl3 und dem ribosomalen Protein Rpl10 in der Monosomenformation**

Da Npl3 mit dem Prä-60S-Partikel während des nukleo-zytoplasmatischen Transports assoziiert (Hackmann et al., 2011), war es von Bedeutung den Verlauf dieser Assoziation zu untersuchen. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit eine starke Interaktion von Npl3 mit dem ribosomalen Protein Rpl10 nachgewiesen werden und diese ist unabhängig von einzelsträngiger RNA (Abbildung 27A). Die stabile Inkorporation von Rpl10 ist der letzte Schritt in der zytoplasmatischen Reifung des Prä-60S-Partikels und vermittelt dessen volle Translationskompetenz (Abbildung 1 und Lo et al., 2010). Dabei assoziiert Rpl10 in der Nähe von Nmd3 mit dem Partikel und stimuliert mit der GTPase Lsg1 die Entlassung von Nmd3. Folglich entspannt sich die Oberfläche des 60S-Partikels und Rpl10 wird wahrscheinlich dadurch in die Endposition gebracht (Sengupta et al., 2010). Da es sehr zweifelhaft ist, daß Npl3 nach dem nukleo-zytoplasmatischen Transport erst vom Prä-60S-Partikel dissoziiert, um nach dem letzten Reifeschritt wieder zu assoziieren, deutet die Interaktion zwischen Npl3 und Rpl10 stark darauf hin, daß Npl3 über den Transport hinaus auch während der gesamten, zytoplasmatischen Umgestaltung

an dem 60S-Partikel gebunden bleibt. Die Ergebnisse zeigen demnach eine Verbindung von Npl3 mit dem translationskompetenten 60S-Partikel und weisen darauf hin, daß Npl3 dadurch das Potential besitzt in den Prozess der Translationsinitiation einzugehen.

Um mehr Aufschluss über den Zusammenhang zwischen Npl3 und Rpl10 zu erhalten, wurde für weitere Analysen eine *RPL10*-Mutante (*rpl10(G161D)*) genutzt. Diese zeichnet sich durch eine Störung in der Bildung des Monosoms in der Translationsinitiation, sichtbar anhand des Schulter-Polysomenprofils, und zusätzlich einer Akkumulation von Prä-60S-Partikeln im Zellkern aus (Abbildung 20, Abbildung 25B und (Hedges et al., 2005)). Die Beeinträchtigung des Prä-60S-Exports entsteht allerdings durch sekundäre Effekte, sehr wahrscheinlich durch das ineffektive Recycling von Nmd3 und dem verringerten Reimport in den Zellkern. Dort kann offenbar der Mangel an nukleärem Nmd3 den Prä-60S-Transport nicht mehr ausreichend gewährleisten (Hedges et al., 2005). Im Gegensatz zu *NMD3*, kann jedoch die Überexpression von *NPL3* in der Mutante *rpl10(G161D)* die Schulterbildung des Polysomenprofils mildern (Abbildung 25A) und den Zellen einen Wachstumsvorteil verschaffen (Doktorarbeit Thomas Groß, AG Krebber). Gleichzeitig führt die Überexpression von *NPL3* dennoch nicht zu einer Kompensation der Prä-60S-Exportdefekte in *rpl10(G161D)*-Zellen (Abbildung 25B). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen demnach verschiedenartige Wirkungen von *NPL3* auf die *RPL10*-Mutante; so werden die Defekte in der Monosomenformierung geschmälert, die nicht aus einem verstärkten Prä-60S-Export hervorgehen, sondern eher aus einer zytoplasmatischen Funktion resultieren.

Anzumerken ist, daß das Protein *rpl10(G161D)* in gleichen Mengen wie Wildtyp-Rpl10 in 60S-Partikel eingebaut wird und auch nach der Temperaturveränderung mit dem Partikel assoziiert bleibt (Abbildung 28). Die Defekte in der Monosomenformation werden also nicht durch die Dissoziation von *rpl10(G161D)* vom 60S-Partikel oder durch den Abbau des mutierten Proteins ausgelöst, sondern wahrscheinlich durch eine strukturelle Veränderung des Proteins, was womöglich die Oberfläche des Partikels verändert und dadurch die Translationskompetenz verringert. Interessanterweise ist Npl3 auch nach der nichtpermissiven Temperatur am 60S-Partikel assoziiert und dessen Bindung wird nicht durch die strukturelle Veränderung von *rpl10(G161D)* gestört (Abbildung 28). Demzufolge könnte eine erhöhte Menge des Proteins Npl3 eine supprimierende Funktion aktiv am 60S-Partikel in *rpl10(G161D)*-Zellen übernehmen.

Erstaunlicherweise ist das Protein *npl3Δ100*, im Gegensatz zu Wildtyp-Npl3, nicht befähigt eine Bindung zu Rpl10 oder Rpl10-enthaltenen Partikeln herzustellen (Abbildung 27A). Dies legt nahe, daß die Defekte von *npl3Δ100*-Zellen in der Verbindung ribosomaler Untereinheiten in der fehlenden Bindung begründet liegen und folglich Störungen in der Proteinbiosynthese ausgelöst werden. Die dargelegte Verbindung zwischen *NPL3* und *RPL10* unterstützt demzufolge die Annahme, daß Npl3 in der Verbindung ribosomaler Untereinheiten in der Translationsinitiation fungiert. Zusätzliche Beobachtungen wie die gegenseitige, positive Beeinflussung zwischen *NPL3* und *FUN12*, wobei *NPL3* wachstumsfördernd auf die Mutante *fun12Δ* bzw. *FUN12* fördernd auf *npl3Δ100*-Zellen wirkt (Abbildung 26 und Doktorarbeit Thomas Groß, AG Krebber), deuten auf eine Funktion von Npl3 in dem letzten Schritt der Translationsinitiation hin. Da Npl3 jedoch nicht im Komplex mit Initiationsfaktoren nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt), ist es unwahrscheinlich, daß Npl3 einen kanonischen Faktor in der Translationsinitiation darstellt. Womöglich fungiert Npl3 aber als Hilfs-Faktor, der an der Bildung des Monosoms an der Schnittstelle der ribosomalen Vereinigung beteiligt ist, vielleicht durch stabilisierende Wirkungen auf das Ribosom selbst oder auf Faktoren die daran mitwirken.

#### 4.4.1.1 Npl3 in der zytoplasmatischen Reifung des 60S-Partikels

Eine weitere Interpretation für die Funktion von Npl3 in der Verbindung ribosomaler Untereinheiten wäre, daß Npl3 unterstützend in der zytoplasmatischen Reifung von Prä-60S-Partikeln eine Rolle spielt und dadurch eine erhöhte Translationskompetenz erzeugt. Das Prä-60S-Partikel durchläuft, um eine Verbindung mit dem 40S-Partikel herstellen zu können um in die Translation einzugehen, eine geordnete Abfolge von Umgestaltungsprozessen im Zytoplasma (Panse, 2011). Fast alle Faktoren, die in diesem Prozess vom Partikel im Zytoplasma abgelöst werden (Nmd3, Rlp24, Tif6, Nog1, Arx1, Alb1, Mrt4), wurden bereits auf das nukleäre Prä-60S-Partikel rekrutiert und begleiten oder unterstützen den nukleo-zytoplasmatischen Transport (Panse and Johnson, 2010 und Tabelle 7). Jedes dieser Proteine bildet ein Target für einen speziellen Reifefaktor, das dessen Aktivität stimuliert oder als Basis für die Bindung an das Partikel fungiert. Der Reifefaktor katalysiert nach der Bindung an die 60S-Untereinheit die Entlassung des jeweiligen Targetproteins. Die entlassenen, nicht-ribosomalen Proteine kehren in den

Zellkern zurück, gehen dort wieder in den nächsten Transport-Zyklus ein und unterstützen erneut den Prä-60S-Export.

Npl3 könnte eine solche zellkernrekrutierte Komponente darstellen, die auch stimulierend auf die Umgestaltung des 60S-Partikels wirkt. Nun gehen jedoch Defekte in der zytoplasmatischen Entlassung der nicht-ribosomalen Komponenten und dem dadurch entstehenden Mangel im Zellkern oft mit einer Beeinträchtigung im Prä-60S-Export und einem Abbau von 60S-Partikeln einher (Tabelle 7 und (Karbstein, 2013; Strunk and Karbstein, 2009)). Diese sekundären Erscheinungen addieren sich mit den primären Defekten in der zytoplasmatischen Reifung. Beide Störungen tragen jeweils zu einer ineffizienten Bildung von Monosomen in der Translation bei (bspw. detaillierte Studie über Nmd3-Entlassung (Hedges et al., 2005)). Die Tabelle 7 listet die bislang bekannten, nicht-ribosomalen Proteine auf, die im Zellkern auf das Prä-60S-Partikel geladen werden und nach dem Transport im Zytoplasma vorliegen. Mutanten dieser Faktoren weisen alle eine Beeinträchtigung der Monosomenbildung in Form eines Polysomenprofils mit Schulter-Bildung auf. Des weiteren zeichnen sie sich durch einen kombinierten Phänotyp aus einem Defekt im Prä-60S-Export, sowie einer reduzierten Menge an 60S-Partikeln aus.

**Tabelle 7: Zellkern-rekrutierte, nicht-ribosomale Faktoren der zytoplasmatischen Prä-60S-Untereinheit**

Faktor	Phänotyp Mutante			Referenz
	Schulter-Polysomenprofil	60S-Menge reduziert	Prä-60S misslokalisiert	
<i>NOG1</i>	Ja	Ja	Ja	(Harnpicharnchai et al., 2001; Saveanu et al., 2003)
<i>RLP24</i>	Ja	Ja	-	(Harnpicharnchai et al., 2001)
<i>MRT4</i>	Ja	Nein/Ja	Ja	(Harnpicharnchai et al., 2001; Kemmler et al., 2009)
<i>ARX1/ALB1</i>	Ja	Ja	Ja	(Hung and Johnson, 2006; Hung et al., 2008; Lebreton et al., 2006)
<i>TIF6</i>	Ja	Ja	Ja	(Basu et al., 2001; Senger et al., 2001; Si and Maitra, 1999)
<i>NMD3</i>	Ja	Ja	Ja	Abbildung 20 und (Gadal et al., 2001)

Nein/Ja, unterschiedliche Beobachtungen in den Referenzen

Eine ähnliche Charakterisierung mit einer Kombination von Störungen zeigen Mutanten der zytoplasmatischen Reifefaktoren der Prä-60S-Untereinheit (Tabelle 8). Das ist nachzuvollziehen, da die Reifefaktoren für die Ablösung der zellkern-rekrutierten, nicht-

ribosomalen Proteine verantwortlich sind, und Störungen im Recycling einen ähnlichen Phänotyp auslösen.

Der Phänotyp der Mutante *np13Δ100* differiert jedoch entscheidend von den Phänotypen der Faktoren aus Tabelle 7 und Tabelle 8. So ist der nukleo-zytoplasmatische Transport von Prä-60S-Partikeln in *np13Δ100*-Zellen intakt (Abbildung 14) und es konnte keine reduzierte Menge an 60S-Partikeln nachgewiesen werden (Abbildung 21), obwohl eine nukleäre Depletion von *np13Δ100* existiert (Abbildung 8). Dies lässt erstens darauf schließen, daß diese Zellen den Prä-60S-Export über alternative Wege gewährleisten können. Zweitens lässt sich daraus ableiten, daß Npl3 wahrscheinlich nicht hauptsächlich in die zytoplasmatische Ablösung eines zellkern-rekrutierten Faktors involviert ist, da kein akkumulierender Effekt in *np13Δ100*-Zellen in 60S-Export-Störungen bzw. 60S-Abbau resultiert.

**Tabelle 8: Einige, nicht-ribosomale, zytoplasmatische Reifefaktoren des Prä-60S-Partikels**

Faktor	Aktivität	Target	Phänotyp Mutante			Quelle
			Schulter-Profil	60S-Menge reduziert	Prä-60S misslokalisiert	
<i>DRG1</i>	AAA-ATPase	Rlp24 (Nog1)	Ja	Ja	Nein	(Kappel et al., 2012; Pertschy et al., 2007)
<i>YVH1</i>	Phosphatase	Mrt4	Ja	Nein	Ja	(Kemmler et al., 2009)
<i>REI1</i>	Zn <sup>2+</sup> -Fingerprotein	Arx1/Alb1	Ja	Ja	Nein/Ja	(Hung and Johnson, 2006; Lebreton et al., 2006)
<i>EFL1</i>	GTPase	Tif6	Ja	Ja	Nein	(Bécam et al., 2001)
<i>SDO1</i>	-	Tif6	n. s.	Ja	Ja	(Menne et al., 2007)
<i>LSG1</i>	GTPase	Nmd3	Ja	Ja	Ja	(Hedges et al., 2005)

Nein/Ja, unterschiedliche Beobachtungen in den Referenzen  
n. s., nicht sichtbar

Dennoch lenken einige Ergebnisse zu einer eventuellen Funktion von Npl3 in dem letzten Reifeschritt, dem Rpl10-Einbau in das 60S-Partikel. Weil die zytoplasmatische Reifung des 60S-Partikels einer Schritt-Abfolge unterliegt und nicht-ribosomale Faktoren nach dem Umgestaltungsschritt das Partikel verlassen, sind Faktoren früher Schritte nicht mit

Faktoren später Prozesse auf einem Partikel zu finden (Lo et al., 2010). Das Protein Npl3 jedoch kopräzipitiert mit dem ausgereiften, Rpl10-haltigen 60S-Partikel, demnach wäre eine Funktion von Npl3 in einem späten oder letzten Reifeprozess denkbar (Abbildung 27A). Zusätzlich deuten die genetische Interaktion zwischen *NPL3* und *RPL10* und die spezifische, fördernde Wirkung von überexprimiertem *NPL3* in *rpl10(G161D)*-Zellen (Abbildung 25A) daraufhin, daß Npl3 in den Schritt des Rpl10-Einbaus involviert ist. In *rpl10(G161D)*-Zellen ist das Recycling von Nmd3 gestört (Hedges et al., 2005), obwohl *rpl10(G161D)* an das 60S-Partikel binden kann (Abbildung 28). Womöglich wird *rpl10(G161D)* nicht effektiv im 60S-Partikel platziert oder die Stimulation von Lsg1 ist verringert, resultierend in einer verminderten Ablösung von Nmd3. Obwohl eine erhöhte Expression von *NMD3* in *rpl10(G161D)*-Zellen wachstumsfördernd und Schulterbildung-reduzierend wirken soll (Hedges et al., 2005), konnte dies in dem Suppressionsversuch der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Bei gleichen Expressionsvoraussetzungen über einen  $2\mu$ -Vektor ist nicht *NMD3*, sondern *NPL3* unterstützend in der Reduktion der Schulter-Ausbildung des Polysomenprofils von *rpl10(G161D)*-Zellen (Abbildung 25A). Zusätzlich hatte überexprimiertes *NMD3* auch keine positive Wirkung auf das Wachstum oder das Polysomenprofil von *npl3 $\Delta$ 100*-Zellen (Abbildung 22). Diese Beobachtungen belegen eine Unterschiedlichkeit in der Wirkung und somit eine differente Funktion von Npl3 und Nmd3. Außerdem zeigen die Ergebnisse, daß Npl3 einen anderen Suppressionseffekt auf die Mutante *rpl10(G161D)* hat, als die bloße Unterstützung im Nmd3-Recycling.

Wenn der letzte zytoplasmatische Reifeschritt (Bindung von Rpl10) in *npl3 $\Delta$ 100*-Zellen gestört wäre, müsste es möglich sein, eine geringere Einbaurate von Rpl10 in das Prä-60S-Partikel zu detektieren. Aber interessanterweise ist die Bindung von Rpl10 im Vergleich zum Wildtyp ungestört (Abbildung 23). Dieses Ergebnis spricht allerdings gegen die Funktion von Npl3 in dem Reifeschritt des Rpl10-Einbaus und weist weiter auf eine intakte Produktion von translationskompetenten 60S-Partikeln in der Mutante *npl3 $\Delta$ 100* hin. Jedoch wäre es sinnvoll bekannte Mutanten der zytoplasmatischen Reifung, bspw. von *LSG1*, auf die Inkorporation von Rpl10 hin zu untersuchen, ob tatsächlich Defekte anhand einer Ko-Immunopräzipitation zu erkennen sind. Folgend sollte geklärt werden, ob eine Störung jedes beliebigen Reifeschritts aus der geordneten Abfolge in einer geringeren Rpl10-60S-Bindung resultieren muss. Zusätzlich können weitere



Suppressionsversuche mit überexprimiertem *NPL3* in Reifefaktor-Mutanten die Möglichkeit bieten, einen Einblick in die potentielle Funktion von Npl3 in anderen zytoplasmatischen Reifeschritten zu erhalten.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit zeigen, daß eine essentielle Funktion von Npl3 in der ribosomalen Vereinigung existiert, die nicht durch die nukleozytoplasmatischen Transporte bedingt wird, sondern im Zytoplasma vorherrscht. Da Npl3 mit translationskompetenten 60S-Partikeln nach der zytoplasmatischen Reifung interagiert, hat es Potential aktiv in die Translation einzugehen. Einige Belege sprechen für eine Rolle von Npl3 im späten Schritt der Translationsinitiation nach der AUG-Erkennung und während der Bildung des Monosoms mit Fun12 und Rpl10. Weitere Ergebnisse lassen zusätzlich die Interpretation einer unterstützenden Funktion von Npl3 in der Bildung translationskompetenter 60S-Partikel zu. So wäre es vorstellbar, daß Npl3 in dem letzten Reifeschritt, der Positionierung von Rpl10 positiv wirkt. Denn nicht jeder Reifefaktor besitzt eine enzymatische Aktivität. Beispielsweise wirkt Sdo1 stimulierend auf die Entlassung von Tif6, während das eigentliche Enzym die GTPase Efl1 ist (Panse and Johnson, 2010). Demnach könnte Npl3 als wichtige Prä-60S-Komponente ribosomale oder nicht-ribosomale Proteine stimulieren oder stabilisieren und dadurch zur Etablierung einer reifen, translationsfähigen Oberfläche des 60S-Partikels beitragen.

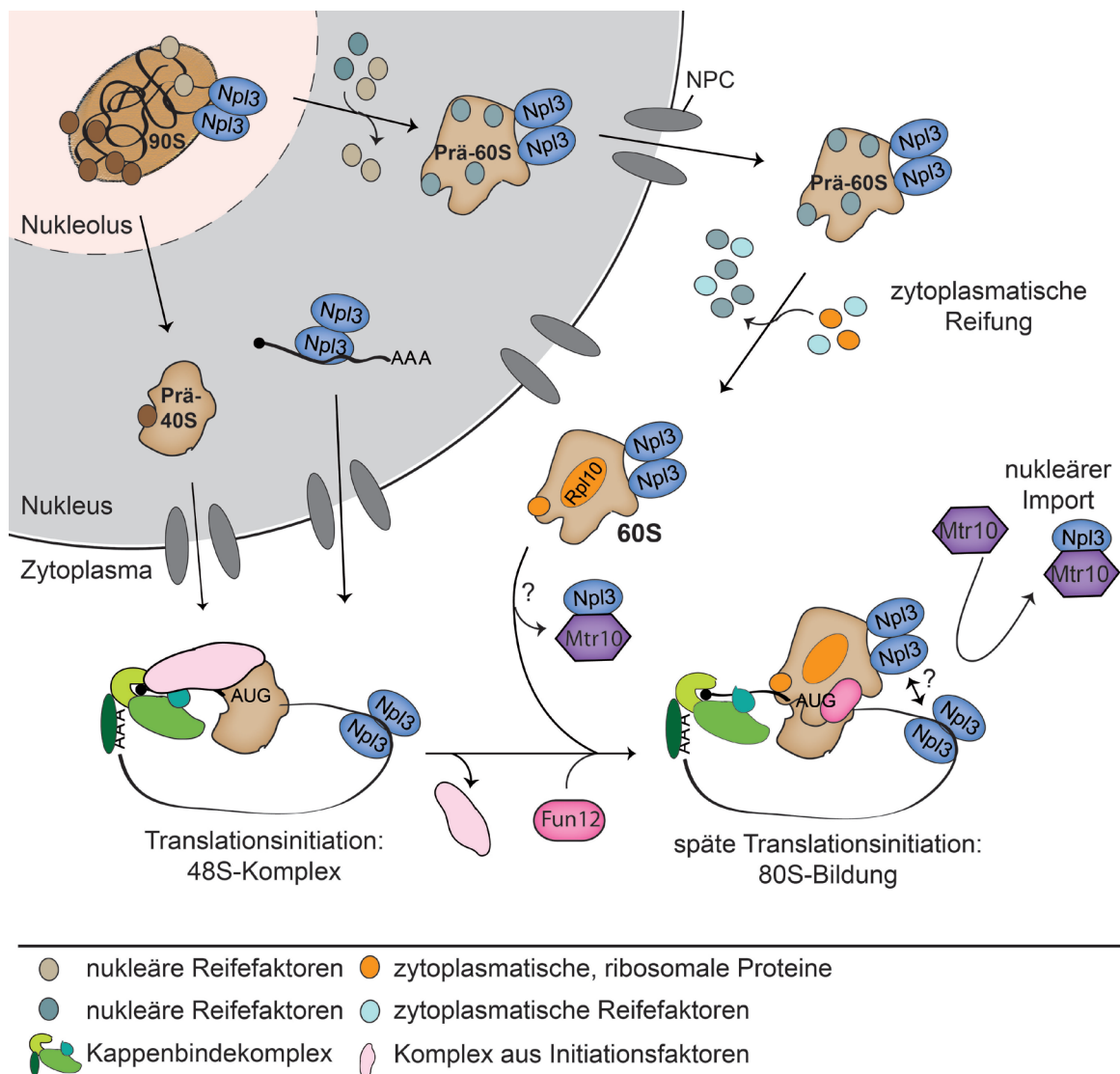
#### **4.4.2 Die Monosomenformation für die Translation wird durch Npl3 unterstützt**

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, daß Npl3 fördernd für die 80S-Bildung in der Translation ist. Sie liefert verschiedene Hinweise für eine Funktion von Npl3 an der Schnittstelle der ribosomalen Verbindung. Dennoch ist auch eine Funktion von Npl3 in der zytoplasmatischen Reifung des 60S-Partikels möglich.

So kann ein Modell vorgeschlagen werden, in dem Npl3 über die nukleären Transportcargos in die Translation eingeht (Abbildung 32). Demnach kann Npl3 bereits früh in der Ribosomenbiogenese die 35S rRNA, Bestandteil des 90S-Partikels, kontaktieren und unterstützt den Transport des Prä-60S-Partikels aus dem Zellkern, womöglich durch den direkten Kontakt mit dem NPC (Hackmann et al., 2011). Des weiteren ist Npl3 Teil des mRNPs und fungiert auch hier als Exportfaktor für den Transport in das Zytoplasma (Lee et al., 1996). Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, daß Npl3-Moleküle miteinander interagieren können (Abbildung 5, Abbildung 6, Abbildung

11). Darüber hinaus kann diese Interaktion im Zellkern und Zytoplasma vorliegen (Abbildung 11). Aufgrund dessen werden Npl3-Moleküle im Modell bereits im Kern für den nukleo-zytoplasmatischen Transport interagierend als mögliche Homodimere dargestellt. Npl3 kann mit Rpl10-haltigen 60S-Partikeln ko-präzipitiert werden (Abbildung 27) und bleibt demzufolge auch nach dem Prä-60S-Export während der gesamten zytoplasmatischen Reifeschritte am Partikel assoziiert. Unter anderem fördern die genetischen Analysen zwischen *NPL3* und *RPL10* (Abbildung 24, Abbildung 25) die Interpretation, daß Npl3 in die Effizienz der 60S-Reifung des letzten Schrittes, der Rpl10-Inkorporation involviert ist. Nach der Entstehung des translationskompetenten 60S-Partikels wäre eine Dissoziation von Npl3 bereits möglich. Die Npl3-Ablösung von Komplexen über den Zellkernimporter Mtr10 wurde bereits im Kontext des mRNA-Transports beschrieben (Senger et al., 2001; Windgassen et al., 2004). Für die Npl3-Entlassung von ribosomalen Strukturen könnte demnach ebenso Mtr10 verantwortlich sein. Da die Npl3-Npl3-Interaktionsdomäne stark mit der Bindedomäne für Mtr10 überlappt (Abbildung 8), bindet Mtr10 womöglich an den C-Terminus von Npl3 kompetitiv und würde die Npl3-Npl3-Interaktion stören bzw. auflösen. Ebenfalls könnte ein ähnlicher Ablösungsmechanismus von mRNA für Npl3 existieren. Trotzdem ist eine gleichzeitige Dissoziation von Npl3 von beiden Transportcargos sehr unwahrscheinlich, da Npl3-Moleküle zu einem beträchtlichen Maß mit aktiv-translatierten mRNAs kopräzipitieren (Abbildung 10 und (Windgassen et al., 2004)).

Nach dem Transport der mRNA ins Zytoplasma kann das Npl3-gebundene Transkript in die Translation eingehen. Die mRNA-assoziierten Initiationsfaktoren rekrutieren das 40S-Partikel und unterstützen das Scanning bis das Startcodon erkannt ist. Nach folgender Dissoziation einiger Initiationsfaktoren assoziieren Fun12 (eIF5B) und die 60S-Untereinheit an den 48S-Komplex. Womöglich wirkt Npl3 auch in diesem Prozess unterstützend, da Ergebnisse, wie die genetische Interaktion und Suppression zwischen *FUN12* und *NPL3*, diese Schlussfolgerung stützen (Abbildung 24, Abbildung 26).



**Abbildung 32: Modell für die Unterstützung von Npl3 in der Monosomenbildung für die Translationsinitiation.** Npl3-Moleküle können im Kern und im Zytoplasma miteinander interagieren und sind hier als Homodimere dargestellt. Npl3 kann bereits mit dem 90S-Partikel assoziieren. Nach der nukleären Reifung des Prä-60S-Partikels transportiert Npl3 das Partikel als Exportfaktor in das Zytoplasma. Dort bleibt Npl3 während der zytoplasmatischen Reifung des 60S-Partikels bis zum Einbau von Rpl10 assoziiert und unterstützt womöglich wichtige Reifeschritte. Es existiert die Möglichkeit der Npl3-Dissoziation und die Auflösung der Homodimere durch Mtr10 bereits nach der Reifung. Da Npl3 auch als Exportfaktor mRNAs in das Zytoplasma transportiert, kann das Npl3-assoziierte Transkript von der Translationsmaschinerie mit dem 40S-Partikel beladen werden. Nach der Erkennung des Startcodons entsteht der 48S-Komplex. Nach der Dissoziation einiger Initiationsfaktoren kann das 60S-Partikel und Fun12 (eIF5B) an die mRNA assoziieren und die Bildung eines Monosoms auslösen. Dies wird möglicherweise auch durch Npl3 unterstützt. Eine eventuelle Mehrfachbindung zwischen Npl3-Proteinen ist hierbei denkbar. Nach der Katalyse durch Fun12 wird das Monosom translationskompetent und geht in die Elongation über. Im Laufe der Translation wird Npl3 vom Importrezeptor Mtr10 gebunden. Dabei löst Mtr10 potentiell die Npl3-Npl3-Verbindung auf und löst Npl3-Proteine von ihren Transportcargos, um sie in den Zellkern zu bringen.

---

Gegebenenfalls wäre eine interagierende Wirkung von Npl3-Molekülen, die am 60S-Partikel und an mRNA gebunden sind, hilfreich für die Zusammenführung beider Komplexe.

In der späten Translationsinitiation katalysiert Fun12 die finale Bildung des elongationskompetenten Monosoms. Die Stärke der Dissoziation von Npl3 von aktiv-translatierten mRNA-Komplexen wird mithilfe von Mtr10 gesteuert (Windgassen et al., 2004). Der Zeitpunkt der Dissoziation ist dabei unbekannt. Vorstellbar ist, daß Npl3-Moleküle und somit die mögliche Spaltung von Npl3-Npl3-Verbindungen nicht nur nach der Beendigung der Initiation sondern in späteren Schritten der Translation, womöglich auch nach einigen Translationszyklen, durch Mtr10 von den Transportcargos abgelöst wird. Über den Mtr10-Import in den Zellkern steht Npl3 wieder neuen Transportzyklen und neuen Npl3-Npl3-Interaktionen zur Verfügung.

---

## Literaturverzeichnis

- Acker, M.G., and Lorsch, J.R.** (2008). Mechanism of ribosomal subunit joining during eukaryotic translation initiation. *Biochemical Society Transactions* 36, 653–657.
- Acker, M.G., Shin, B.-S., Nanda, J.S., Saini, A.K., Dever, T.E., and Lorsch, J.R.** (2009). Kinetic analysis of late steps of eukaryotic translation initiation. *Journal of Molecular Biology* 385, 491–506.
- Aitken, C.E., and Lorsch, J.R.** (2012). A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature Structural & Molecular Biology* 19, 568–576.
- Bassler, J., Grandi, P., Gadal, O., Lessmann, T., Petfalski, E., Tollervey, D., Lechner, J., and Hurt, E.** (2001). Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Molecular Cell* 8, 517–529.
- Basu, U., Si, K., Warner, J., and Maitra, U.** (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* TIF6 gene encoding translation initiation factor 6 is required for 60S ribosomal subunit biogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 21, 1453–1462.
- Bécam, a M., Nasr, F., Racki, W.J., Zagulski, M., and Herbert, C.J.** (2001). Rialp (Ynl163c), a protein similar to elongation factors 2, is involved in the biogenesis of the 60S subunit of the ribosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Genetics and Genomics* : MGG 266, 454–462.
- Birney, E., Kumar, S., and Krainer, A.R.** (1993). Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Research* 21, 5803–5816.
- Bodenmiller, B., Wanka, S., and Kraft, C.** (2010). Phosphoproteomic analysis reveals interconnected system-wide responses to perturbations of kinases and phosphatases in yeast. *Science Signalling* 3.
- Bradatsch, B., Katahira, J., Kowalinski, E., Bange, G., Yao, W., Sekimoto, T., Baumgärtel, V., Boese, G., Bassler, J., Wild, K., et al.** (2007). Arx1 functions as an unorthodox nuclear export receptor for the 60S preribosomal subunit. *Molecular Cell* 27, 767–779.
- Breeuwer, M., and Goldfarb, D.S.** (1990). Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins. *Cell* 60, 999–1008.
- Brina, D., Grosso, S., Miluzio, A., and Biffo, S.** (2011). Translational control by 80S formation and 60S availability: The central role of eIF6, a rate limiting factor in cell cycle progression and tumorigenesis. *Cell Cycle* 10, 3441–3446.
- Bucheli, M.E., and Buratowski, S.** (2005). Npl3 is an antagonist of mRNA 3' end formation by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* 24, 2150–2160.

- Busch, A., and Hertel, K.** (2012). Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 3, 1–12.
- Caceres, J.F., Screaton, G.R., and Krainer, a. R.** (1998). A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes & Development* 12, 55–66.
- Chen, Y.-C., Milliman, E.J., Goulet, I., Côté, J., Jackson, C. a, Vollbracht, J. a, and Yu, M.C.** (2010). Protein arginine methylation facilitates cotranscriptional recruitment of pre-mRNA splicing factors. *Molecular and Cellular Biology* 30, 5245–5256.
- Choi, S.K.** (1998). Promotion of Met-tRNA<sup>i</sup>Met Binding to Ribosomes by yIF2, a Bacterial IF2 Homolog in Yeast. *Science* 280, 1757–1760.
- Choi, S.K., Olsen, D.S., Roll-Mecak, a, Martung, a, Remo, K.L., Burley, S.K., Hinnebusch, a G., and Dever, T.E.** (2000). Physical and functional interaction between the eukaryotic orthologs of prokaryotic translation initiation factors IF1 and IF2. *Molecular and Cellular Biology* 20, 7183–7191.
- Chook, Y.M., and Süel, K.E.** (2011). Nuclear import by karyopherin-βs: recognition and inhibition. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1813, 1593–1606.
- Christianson, T.W., Sikorski, R.S., Dante, M., Shero, J.H., and Hieter, P.** (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110, 119–122.
- Dange, T., Grünwald, D., Grünwald, A., Peters, R., and Kubitscheck, U.** (2008). Autonomy and robustness of translocation through the nuclear pore complex: a single-molecule study. *The Journal of Cell Biology* 183, 77–86.
- Dermody, J.L., Dreyfuss, J.M., Villén, J., Ogundipe, B., Gygi, S.P., Park, P.J., Ponticelli, A.S., Moore, C.L., Buratowski, S., and Bucheli, M.E.** (2008). Unphosphorylated SR-like protein Npl3 stimulates RNA polymerase II elongation. *PloS One* 3, e3273.
- Eisinger, D.P., Dick, F.A., and Trumpower, B.L.** (1997). Qsr1p , a 60S ribosomal subunit protein , is required for joining of 40S and 60S subunits . Qsr1p , a 60S Ribosomal Subunit Protein , Is Required for Joining of 40S and 60S Subunits. 17.
- Ficarro, S.B., McClelland, M.L., Stukenberg, P.T., Burke, D.J., Ross, M.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and White, F.M.** (2002). Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnology* 20, 301–305.
- Fried, H., and Kutay, U.** (2003). Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 60, 1659–1688.
- Fringer, J.M., Acker, M.G., Fekete, C. a, Lorsch, J.R., and Dever, T.E.** (2007). Coupled release of eukaryotic translation initiation factors 5B and 1A from 80S ribosomes following subunit joining. *Molecular and Cellular Biology* 27, 2384–2397.

- Fu, X.** (1995). The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA* *1*, 663–680.
- Gadal, O., Strauß, D., Kessl, J., Trumpower, B., Tollervey, D., and Hurt, E.D.** (2001). Nuclear Export of 60S Ribosomal Subunits Depends on Xpo1p and Requires a Nuclear Export Sequence-Containing Factor, Nmd3p, That Associates with the Large Subunit Protein Rpl10p. *Molecular and Cellular Biology* *21*, 3405–3415.
- Gandin, V., Miluzio, A., Barbieri, A., Beugnet, A., Kiyokawa, H., Marchisio, P., and Biffo, S.** (2008). Eukaryotic initiation factor 6 is rate-limiting in translation, growth and transformation. *Nature* *455*, 684–688.
- Gary, J.D., Lin, W.J., Yang, M.C., Herschman, H.R., and Clarke, S.** (1996). The predominant protein-arginine methyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* *271*, 12585–12594.
- Gebauer, F., and Hentze, M.W.** (2004). MOLECULAR MECHANISMS OF TRANSLATIONAL CONTROL. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *5*, 827–835.
- Gietz, D., St Jean, a, Woods, R. a, and Schiestl, R.H.** (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research* *20*, 1425.
- Gilbert, W., and Guthrie, C.** (2004). The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA. *Molecular Cell* *13*, 201–212.
- Gilbert, W., Siebel, C.W., and Guthrie, C.** (2001). Phosphorylation by Sky1p promotes Npl3p shuttling and mRNA dissociation. *RNA (New York, N.Y.)* *7*, 302–313.
- Gorsch, L.C., Dockendorff, T.C., and Cole, C.N.** (1995). A Conditional Allele of the Novel Repeat-containing Yeast Nucleoporin. *The Journal of Cell Biology* *129*, 939–955.
- Görlich, D., and Kutay, U.** (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annual Review of Cell and Developmental ...* *15*, 607–660.
- Güttler, T., and Görlich, D.** (2011). Ran-dependent nuclear export mediators: a structural perspective. *The EMBO Journal* *30*, 3457–3474.
- Hackmann, A., Gross, T., Baierlein, C., and Krebber, H.** (2011). The mRNA export factor Npl3 mediates the nuclear export of large ribosomal subunits. *EMBO Reports* *12*, 1024–1031.
- Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C.J., et al.** (2001). Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Molecular Cell* *8*, 505–515.

- Hedges, J., West, M., and Johnson, A.W.** (2005). Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. *The EMBO Journal* *24*, 567–579.
- Helser, T.L., Baan, R.A., and Dahlberg, A.E.** (1981). Characterization of a 40S ribosomal subunit complex in polyribosomes of *Saccharomyces cerevisiae* treated with cycloheximide. *Molecular and Cellular Biology* *1*, 51–57.
- Henry, M.F., and Silver, P. a** (1996). A novel methyltransferase (Hmt1p) modifies poly(A)+-RNA-binding proteins. *Molecular and Cellular Biology* *16*, 3668–3678.
- Hinnebusch, A.G.** (2006). eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends in Biochemical Sciences* *31*, 553–562.
- Hinnebusch, A.G.** (2011). Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR *75*, 434–67, first page of table of contents.
- Hinnebusch, A.G., and Lorsch, J.R.** (2012). The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *4*, 1–25.
- Hodge, C. a, Colot, H. V, Stafford, P., and Cole, C.N.** (1999). Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. *The EMBO Journal* *18*, 5778–5788.
- Huang, Y., and Steitz, J. a** (2005). SRprises along a messenger’s journey. *Molecular Cell* *17*, 613–615.
- Huang, Y., Gattoni, R., Stévenin, J., and Steitz, J.** (2003). SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Molecular Cell* *11*, 837–843.
- Hung, N., and Johnson, A.** (2006). Nuclear recycling of the pre-60S ribosomal subunit-associated factor Arx1 depends on Rei1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* *26*, 3718–3727.
- Hung, N., Lo, K., and Patel, S.** (2008). Arx1 is a nuclear export receptor for the 60S ribosomal subunit in yeast. *Molecular Biology of ...* *19*, 735–744.
- Häcker, S., and Krebber, H.** (2004). Differential export requirements for shuttling serine/arginine-type mRNA-binding proteins. *The Journal of Biological Chemistry* *279*, 5049–5052.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T. V** (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* *11*, 113–127.
- Jenner, L., Melnikov, S., De Loubresse, N.G., Ben-Shem, A., Iskakova, M., Urzhumtsev, A., Meskauskas, A., Dinman, J., Yusupova, G., and Yusupov, M.**



- (2012). Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Current Opinion in Structural Biology* 22, 759–767.
- Kappel, L., Loibl, M., Zisser, G., Klein, I., Fruhmman, G., Gruber, C., Unterweger, S., Rechberger, G., Pertschy, B., and Bergler, H.** (2012). Rlp24 activates the AAA-ATPase Drg1 to initiate cytoplasmic pre-60S maturation. *The Journal of Cell Biology* 199, 771–782.
- Karbstein, K.** (2013). Quality control mechanisms during ribosome maturation. *Trends in Cell Biology* 23, 242–250.
- Kemmler, S., Occhipinti, L., Veisu, M., and Panse, V.G.** (2009). Yvh1 is required for a late maturation step in the 60S biogenesis pathway. *The Journal of Cell Biology* 186, 863–880.
- Kerppola, T.** (2006). Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 449–456.
- Kim Guisbert, K., Duncan, K., Li, H., and Guthrie, C.** (2005). Functional specificity of shuttling hnRNPs revealed by genome-wide analysis of their RNA binding profiles. *RNA (New York, N.Y.)* 11, 383–393.
- Kiseleva, E., Goldberg, M.W., Allen, T.D., and Akey, C.W.** (1998). Active nuclear pore complexes in *Chironomus*: visualization of transporter configurations related to mRNP export. *Journal of Cell Science* 111 (Pt 2), 223–236.
- Kress, T.L., Krogan, N.J., and Guthrie, C.** (2008). A single SR-like protein, Npl3, promotes pre-mRNA splicing in budding yeast. *Molecular Cell* 32, 727–734.
- Kressler, D., Hurt, E., and Bassler, J.** (2010). Driving ribosome assembly. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1803, 673–683.
- Lai, M.-C., and Tarn, W.-Y.** (2004). Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 31745–31749.
- Lebreton, A., Saveanu, C., Decourty, L., Rain, J.-C., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M.** (2006). A functional network involved in the recycling of nucleocytoplasmic pre-60S factors. *The Journal of Cell Biology* 173, 349–360.
- Lee, M.S., Henry, M., and Silver, P. a** (1996). A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export. *Genes & Development* 10, 1233–1246.
- LeFebvre, A.K., Korneeva, N.L., Trutschl, M., Cvek, U., Duzan, R.D., Bradley, C. a, Hershey, J.W.B., and Rhoads, R.E.** (2006). Translation initiation factor eIF4G-1 binds to eIF3 through the eIF3e subunit. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 22917–22932.

- Lei, E.P., Krebber, H., and Silver, P.A.** (2001). Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription. *Genes and Development* 15, 1771–1782.
- Leppek, K., Schott, J., and Stoecklin, G.** (2011). Protein synthesis and translational control: at eye level with the ribosome. *EMBO Reports* 12, 1214–1216.
- Lo, K.-Y., Li, Z., Wang, F., Marcotte, E.M., and Johnson, A.W.** (2009). Ribosome stalk assembly requires the dual-specificity phosphatase Yvh1 for the exchange of Mrt4 with P0. *The Journal of Cell Biology* 186, 849–862.
- Lo, K.-Y., Li, Z., Bussiere, C., Bresson, S., Marcotte, E.M., and Johnson, A.W.** (2010). Defining the pathway of cytoplasmic maturation of the 60S ribosomal subunit. *Molecular Cell* 39, 196–208.
- Lukasiewicz, R., Nolen, B., Adams, J. a, and Ghosh, G.** (2007). The RGG domain of Npl3p recruits Skylp through docking interactions. *Journal of Molecular Biology* 367, 249–261.
- McBride, A.E., Cook, J.T., Stemmler, E. a, Rutledge, K.L., McGrath, K. a, and Rubens, J. a** (2005). Arginine methylation of yeast mRNA-binding protein Npl3 directly affects its function, nuclear export, and intranuclear protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 30888–30898.
- Menne, T.F., Goyenechea, B., Sánchez-Puig, N., Wong, C.C., Tonkin, L.M., Ancliff, P.J., Brost, R.L., Costanzo, M., Boone, C., and Warren, A.J.** (2007). The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nature Genetics* 39, 486–495.
- Meyer, A.E., Hoover, L. a, and Craig, E. a** (2010). The cytosolic J-protein, Jjj1, and Reil function in the removal of the pre-60 S subunit factor Arx1. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 961–968.
- Michlewski, G., Sanford, J.R., and Cáceres, J.F.** (2008). The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Molecular Cell* 30, 179–189.
- Milkereit, P., Strauss, D., Bassler, J., Gadal, O., Kühn, H., Schütz, S., Gas, N., Lechner, J., Hurt, E., and Tschochner, H.** (2003). A Noc complex specifically involved in the formation and nuclear export of ribosomal 40 S subunits. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 4072–4081.
- Natalizio, B.J., and Wente, S.R.** (2013). Postage for the messenger: designating routes for nuclear mRNA export. *Trends in Cell Biology* 1–9.
- Oeffinger, M.** (2010). Joining the interface: a site for Nmd3 association on 60S ribosome subunits. *The Journal of Cell Biology* 189, 1071–1073.
- O'Reilly, A.J., Dacks, J.B., and Field, M.C.** (2011). Evolution of the karyopherin- $\beta$  family of nucleocytoplasmic transport factors; ancient origins and continued specialization. *PloS One* 6, e19308.

- Panse, V.G.** (2011). Getting ready to translate: cytoplasmic maturation of eukaryotic ribosomes. *Chimia* 65, 765–769.
- Panse, V.G., and Johnson, A.W.** (2010). Maturation of eukaryotic ribosomes : acquisition of functionality. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 260–266.
- Pertschy, B., Saveanu, C., Zisser, G., Lebreton, A., Tengg, M., Jacquier, A., Liebminger, E., Nobis, B., Kappel, L., Van der Klei, I., et al.** (2007). Cytoplasmic recycling of 60S preribosomal factors depends on the AAA protein Drg1. *Molecular and Cellular Biology* 27, 6581–6592.
- Pestova, T. V, Lomakin, I.B., Lee, J.H., Choi, S.K., Dever, T.E., and Hellen, C.U.** (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403, 332–335.
- Phan, L., Schoenfeld, L., Valášek, L., Nielsen, K.H., and Hinnebusch, A.G.** (2001). A subcomplex of three eIF3 subunits binds eIF1 and eIF5 and stimulates ribosome binding of mRNA and tRNA<sup>iMet</sup>. *The EMBO ...* 20, 2954–2965.
- Rajyaguru, P., She, M., and Parker, R.** (2012). Scd6 targets eIF4G to repress translation: RGG motif proteins as a class of eIF4G-binding proteins. *Molecular Cell* 45, 244–254.
- Risso, G., Pelisch, F., Quaglino, A., Pozzi, B., and Anabella, S.** (2012). Regulating the regulators: Serine/arginine-rich proteins under scrutiny. *IUBMB Life* 64, 809–816.
- Rose, M.D., Winston, F., and Hieter, P.** (1990). *Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santos-Rosa, H., Moreno, H., Simos, G., Segref, A., Fahrenkrog, B., Panté, N., and Hurt, E.** (1998). Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Molecular and Cellular Biology* 18, 6826–6838.
- Saveanu, C., Namane, A., Gleizes, P.-E., Lebreton, A., Rousselle, J.-C., Noaillac-Depeyre, J., Gas, N., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M.** (2003). Sequential protein association with nascent 60S ribosomal particles. ... and *Cellular Biology* 23, 4449–4460.
- Schmitt, C., Von Kobbe, C., Bachi, a, Panté, N., Rodrigues, J.P., Boscheron, C., Rigaut, G., Wilm, M., Séraphin, B., Carmo-Fonseca, M., et al.** (1999). Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. *The EMBO Journal* 18, 4332–4347.
- Schäfer, T., Strauß, D., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E.** (2003). The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S. *The EMBO Journal* 22, 1370–1380.

- Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., Lührmann, R., and Hurt, E.** (1997). Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)+ RNA and nuclear pores. *The EMBO Journal* *16*, 3256–3271.
- Senger, B., Simos, G., Bischoff, F.R., Podtelejnikov, a, Mann, M., and Hurt, E.** (1998). Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p. *The EMBO Journal* *17*, 2196–2207.
- Senger, B., Lafontaine, D.L., Graindorge, J.S., Gadai, O., Camasses, a, Sanni, a, Garnier, J.M., Breitenbach, M., Hurt, E., and Fasiolo, F.** (2001). The nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p are required for a late cytoplasmic step of ribosome synthesis. *Molecular Cell* *8*, 1363–1373.
- Sengupta, J., Bussiere, C., Pallesen, J., West, M., Johnson, A.W., and Frank, J.** (2010). Characterization of the nuclear export adaptor protein Nmd3 in association with the 60S ribosomal subunit. *The Journal of Cell Biology* *189*, 1079–1086.
- Shen, E.C., Henry, M.F., Weiss, V.H., Valentini, S.R., Silver, P. a., and Lee, M.S.** (1998). Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes & Development* *12*, 679–691.
- Shin, B.-S., Maag, D., Roll-Mecak, A., Arefin, M.S., Burley, S.K., Lorsch, J.R., and Dever, T.E.** (2002). Uncoupling of initiation factor eIF5B/IF2 GTPase and translational activities by mutations that lower ribosome affinity. *Cell* *111*, 1015–1025.
- Si, K., and Maitra, U.** (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 6 does not function as a translation initiation factor. *Molecular and Cellular Biology* *19*, 1416–1426.
- Siebel, C., and Guthrie, C.** (1996). The essential yeast RNA binding protein Npl3p is methylated. ... of the National Academy of ... *93*, 13641–13646.
- Sikorski, R., and Hieter, P.** (1989). A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces ceratisiae*. *Genetics* *122*, 19–27.
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G.** (2007). New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Molecular Cell* *28*, 721–729.
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G.** (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* *136*, 731–745.
- Spahn, C.M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P. a, Sali, a, Blobel, G., and Frank, J.** (2001). Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* *107*, 373–386.
- Strunk, B.S., and Karbstein, K.** (2009). Powering through ribosome assembly. *RNA* (New York, N.Y.) *15*, 2083–2104.

- Strunk, B.S., Novak, M.N., Young, C.L., and Karbstein, K.** (2012). A translation-like cycle is a quality control checkpoint for maturing 40S ribosome subunits. *Cell* *150*, 111–121.
- Taura, T., Krebber, H., and Silver, P. a** (1998). A member of the Ran-binding protein family, Yrb2p, is involved in nuclear protein export. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 7427–7432.
- Tieg, B., and Krebber, H.** (2012). Dbp5 - From nuclear export to translation. *Biochimica Et Biophysica Acta*.
- Topisirovic, I., Svitkin, Y. V, Sonenberg, N., and Shatkin, A.J.** (2011). Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA* *2*, 277–298.
- Tutucci, E., and Stutz, F.** (2011). Keeping mRNPs in check during assembly and nuclear export. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* *12*, 377–384.
- Wahl, M.C., Will, C.L., and Lührmann, R.** (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* *136*, 701–718.
- Wente, S.R., and Rout, M.P.** (2010). The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *2*, a000562.
- West, M., and Hedges, J.** (2005). Defining the order in which Nmd3p and Rpl10p load onto nascent 60S ribosomal subunits. *Molecular and Cellular ...* *25*, 3802–3813.
- West, M., Hedges, J.B., Lo, K.-Y., and Johnson, A.W.** (2007). Novel interaction of the 60S ribosomal subunit export adapter Nmd3 at the nuclear pore complex. *The Journal of Biological Chemistry* *282*, 14028–14037.
- Windgassen, M., and Krebber, H.** (2003). Identification of Gbp2 as a novel poly(A)+ RNA-binding protein involved in the cytoplasmic delivery of messenger RNAs in yeast. *EMBO Reports* *4*, 278–283.
- Windgassen, M., Sturm, D., Cajiga, I.J., Gonzalez, C.I., Seedorf, M., Bastians, H., and Krebber, H.** (2004). Yeast shuttling SR proteins Npl3p, Gbp2p, and Hrb1p are part of the translating mRNPs, and Npl3p can function as a translational repressor. ... and *Cellular Biology* *24*, 10479–10491.
- Wong, C.-M., Tang, H.-M.V., Kong, K.-Y.E., Wong, G.-W.O., Qiu, H., Jin, D.-Y., and Hinnebusch, A.G.** (2010). Yeast arginine methyltransferase Hmt1p regulates transcription elongation and termination by methylating Npl3p. *Nucleic Acids Research* *38*, 2217–2228.
- Yao, W., Roser, D., Köhler, A., Bradatsch, B., Bassler, J., and Hurt, E.** (2007). Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2. *Molecular Cell* *26*, 51–62.

- Yao, W., Lutzmann, M., and Hurt, E.** (2008). A versatile interaction platform on the Mex67-Mtr2 receptor creates an overlap between mRNA and ribosome export. *The EMBO Journal* 27, 6–16.
- Yao, Y., Demoinet, E., Saveanu, C., Lenormand, P., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M.** (2010). Ecm1 is a new pre-ribosomal factor involved in pre-60S particle export. *RNA (New York, N.Y.)* 16, 1007–1017.
- Yu, M.C., Bachand, F., McBride, A.E., Komili, S., Casolari, J.M., and Silver, P.A.** (2004). Arginine methyltransferase affects interactions and recruitment of mRNA processing and export factors. *Genes & Development* 18, 2024–2035.

## Abkürzungen

A. dest.	Aqua destillata
AS	Amionsäurerest
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
FOA	5-Fluoroorotsäure
g	Erdbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
HRP	Meerrettich-Peroxidase
kb	Kilobasenpaare
mRNA	messenger ribonucleo acid
mRNP	messenger ribonucleo protein
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel



# Wissenschaftlicher Werdegang

## Publikationen:

**Baierlein, C.**, Hackmann, A., Gross T., Henker, L., Hinz, F., Krebber, H. (2013) Monosome Formation during Translation Initiation Requires the SR Protein Npl3. *Mol. Cell. Biol.*, 33(24):4811-23

Lehnik-Habrink, M., Rempeters, L., Kovács, A.T., Wrede, C., **Baierlein, C.**, Krebber, H., Kuipers, O.P., Stülke, J. (2012) The DEAD-box RNA helicases in *Bacillus subtilis* have multiple functions and act independent from each other. *J Bacteriol.* 195(3):534-44.

Hackmann, A., Gross, T., **Baierlein, C.**, Krebber, H. (2011) The mRNA export factor Npl3 mediates the nuclear export of large ribosomal subunits. *EMBO Rep.* 12(10): 1024 - 1031.

**Baierlein, C.**, Krebber, H. (2010) Translation termination: New factors and insights. *RNA Biol.* 7(5): 548 - 550.

Khoshnevis, S., Gross, T., Rotte, C., **Baierlein, C.**, Ficner, R., Krebber, H. (2010) The iron-sulphur protein RNase L inhibitor functions in translation termination. *EMBO Rep.* 11(3): 214 - 219.

## Posterpräsentationen:

Gross, T., **Baierlein, C.**, Hackmann, A., Forster, N., Krebber, H. (2009) The yeast mRNA export factor Npl3p functions in translation initiation. *EMBO Conference Series on Protein Synthesis and Translational Control*, Heidelberg, Deutschland

Gross, T., **Baierlein, C.**, Hackmann, A., Forster, N., Krebber, H. (2009) The yeast mRNA export factor Npl3p functions in translation initiation. *Intra- and Intercellular Transport and Communication (IITC)*, Marburg, Deutschland

## **Verzeichnis der Akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren in Dresden:

Barth, Göttfert, Rieber, Rödel, Röske

und in Bayreuth:

Dettner, Hoffmann, Jensen, Liede-Schumann, Meve, Meyer, Seifert, Tenhunen,  
Westermann.

# Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Allen voran danke ich Prof. Dr. Heike Krebber, die mir die Möglichkeit gab in ihrem Labor interessante Themen zu bearbeiten und mich immer wieder mit ihrem wissenschaftlichen Engagement und ihrer doktorandennahen Betreuung motivieren konnte.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Müller aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, für die guten Arbeitsmöglichkeiten in Marburg. Auch danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Müller, insbesondere PD Dr. Wolfgang Meißner und Ulrike Schülke, die mir oft mit nützlichen Ratschlägen geholfen haben.

Herzlichen Dank an meine aktuellen und ehemaligen Kollegen der AG Krebber. Das Laborleben war durch eine offene und fröhliche Arbeitsatmosphäre, ständige Hilfsbereitschaft und gute Teamfähigkeit geprägt. Thomas Groß danke ich für die anfängliche Zusammenarbeit im Projekt. Alexandra Hackmann, Haijia Wu und Lysann Henker danke ich für die Zeit in Marburg sowie in Göttingen und Wilfried Kramer sowie Bettina Tieg für die angenehme Göttinger Zeit. Außerdem bin ich sehr dankbar für die kollegiale Ausdauer bei eventuell sehr detail-reichen Ausführungen meinerseits und bei der Erduldung etwaiger ironischer Scherze. Besonders danke ich Bettina und Lysann für ihre stete Diskussionsbereitschaft. Vielen Dank auch an Frederik Hinz für die tatkräftige Unterstützung während seiner Diplomarbeitszeit.

Lieben Dank auch an die ehemaligen und aktuellen Mitglieder der gesamten AG Bastians, allen voran Ailine und Norman, sowie Phillip und Markus.

Weiterhin danke ich aus Marburg der Arbeitsgruppe Lill, insbesondere PD Dr. Ulrich Mühlenhoff für seine stete Gesprächsbereitschaft und für die zahlreichen Gaben u. a. in Form von Stämmen. Aus Göttingen danke ich der AG Braus ebenfalls für die Bereitstellung von Hefe-Kollektionen.

Vielen Dank auch an die ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe Ficner: Sohail Khoshnevis und Marcus Resch, für ihre Expertise in der Proteinaufreinigung.

Schließlich danke ich von ganzem Herzen meiner lieben Familie, besonders meinen Eltern und Geschwistern. Mit ihrer Beständigkeit und Fürsorge war und ist sie immer ein Fels in der Brandung und ein Ort tiefen Vertrauens. Die letzten Jahre war überdies Andreas Leimbach in allen Lebenslagen immer an meiner Seite und ein sehr großer Halt; ein besonderer Dank an ihn.